



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade de Lisboa**



## **Bioacessibilidade de Ácidos Gordos Ómega-3**

### **Dourada *versus* Suplementos Alimentares**

**Francisca Joana Parreira Costa Alves**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

Coorientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

#### **Júri:**

PRESIDENTE: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

VOGAIS: Doutor Miguel Pedro Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Narcisa Mestre Bandarra, Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

**2014**

## **Agradecimentos**

Não poderia agradecer a qualquer outra pessoa sem, antes de mais, agradecer à Bolseira de Investigação Sara Costa, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), pela paciência e disponibilidade constantes, ao longo destes meses de trabalho, que resultaram nesta dissertação. A Sara foi um apoio incondicional e eu nunca terei palavras suficientemente representativas do quanto me sinto grata.

Agradeço à Dr.<sup>a</sup> Narcisa Bandarra, Investigadora Auxiliar do IPMA, que depositou em mim a confiança necessária e me incentivou a nunca desistir, nem parar de me questionar.

A minha orientadora, a Professora Maria Luísa Louro, que me pôs em contacto com a Dr.<sup>a</sup> Narcisa Bandarra, do IPMA, foi igualmente fundamental em todo este processo.

Este trabalho jamais teria sido realizado sem a contribuição do IPMA, que me acolheu para este estágio. Para além disso, considero que o bom ambiente de trabalho é fundamental para o sucesso de cada dia. Assim, agradeço a todas as pessoas que diariamente me receberam com um sorriso e uma palavra de apoio.

À Inês Andrade e à Irina Godinho, colegas de mestrado do Instituto Superior de Agronomia, com quem partilhei todas as horas de almoço e os restantes momentos de pausa, após longos períodos de ensaios laboratoriais e análise de resultados.

Agradeço em especial aos meus pais, que sempre me apoiaram de forma incondicional, ao longo de todo o meu percurso académico, e me deram liberdade para tomar decisões necessárias. Não posso esquecer a restante família, que perdoou todas as minhas ausências, consequentes do trabalho realizado para a concretização deste projeto.

Por fim, agradeço aos meus amigos, que sempre tiveram uma palavra de apoio e total disponibilidade para me ajudarem cada vez que precisei.

### Resumo

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito dos tratamentos culinários na composição lipídica da dourada, bem como avaliar a bioacessibilidade dos ácidos gordos ómega-3 nesta espécie e num suplemento de ácidos gordos ómega-3. Assim, tanto a dourada, como o suplemento foram submetidos a um modelo digestivo *in vitro*.

Verificou-se que grelhar a dourada provocou diminuição do seu teor lipídico e mais concretamente perda de ácidos gordos, mas não alterou a distribuição das classes de lípidos.

Relativamente à bioacessibilidade dos ácidos gordos ómega-3, concluiu-se que, para a dourada e para o suplemento alimentar, nem todos os ácidos gordos que constituíam a matriz inicial ficam bioacessíveis. Na dourada crua, o EPA tem uma taxa de bioacessibilidade de 60% e o DHA de 61%. Na dourada grelhada, os valores de bioacessibilidade foram ligeiramente inferiores, com o EPA e a ser 46% bioacessível e o DHA 43%. No suplemento alimentar, a taxa de bioacessibilidade do EPA foi de 54% e a do DHA de 55%.

**Palavras-chave:** bioacessibilidade, dourada, suplemento alimentar, ácidos gordos ómega-3, EPA, DHA.

## **Abstract**

This paper aims to determine the effect of culinary treatments in the lipidic composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*). It also aims to evaluate the bioaccessibility of omega-3 fatty acids in this species and in dietary supplements. In order to carry out this work, both the gilthead seabream as well as the dietary supplement were submitted to a digestive model *in vitro*.

We were able to verify that grilling the seabream did cause a decrease of the lipidic content and, more specifically, the loss of fatty acids, though it did not modify the distribution of the lipid classes.

With respect to the bioaccessibility of omega-3 fatty acids, we concluded that, both in seabream and dietary supplement, not the total amount of omega 3 fatty acids found in the initial matrix became bioaccessible. In the case of raw fish species, EPA had a bioaccessibility rate of 60% and DHA 61%. In grilled seabream, the bioaccessibility values were slightly diminished, with the values of bioaccessibility of EPA of 46% and DHA of 43%. Concerning the dietary supplement, the bioaccessibility rate of EPA was 54% and DHA 55%.

**Keywords:** bioaccessibility, gilthead seabream, dietary supplement, omega-3 fatty acids, EPA, DHA.

## Extended Abstract

The Portuguese diet always presented a high amount of seafood. The Mediterranean diet, which is considered to be one of the most healthy and beneficial to well being, includes a large amount of fish. The popularity of fish has increased through time and it is no longer exclusive to the diets of coastal inhabitants.

The chemical composition of fish is already well documented and it is known that is an important source of proteins, unsaturated lipids, vitamins and minerals. The high percentage of omega-3 fatty acids gives an important contribution within the prevention of cardiovascular diseases and in the cognitive development.

After cooking, the components of food may change. Moreover, human organism is unable to assimilate the nutrients in the natural form. After digestion, the food matrix is decomposed into simpler molecules, which can then be assimilated by the organism.

This work aims to evaluate the effect of the culinary treatments in the lipidic content and composition of gilthead seabream, as well as evaluate the bioaccessibility of the omega-3 fatty acids in this species and in dietary supplements. In order to carry this out, both the seabream as well as the dietary supplement were submitted to a digestive model *in vitro*.

The seabream was grilled only with salt. Afterwards, both the raw and the grilled fish were submitted to a laboratorial digestive process, resulting in the mimic's human digestion by means of mechanical action and addition of the juices that are part of the process. The juices were prepared using both organic and inorganic solutions and enzymes.

We were able to verify that grilling of seabream caused a decrease in its lipidic content and particularly the loss of omega-3 fatty acids, although it did not modify the distribution of lipid classes.

Both in raw and grilled seabream, as well as in the dietary supplements, the most bioaccessible fatty acid fraction were the monounsaturated. Concerning the bioaccessibility of the omega-3 fatty acids, we can conclude that, for the seabream and dietary supplements, not the totality of lipids present in the initial matrix became bioaccessible. In raw seabream, EPA has a bioaccessibility rate of 60% and DHA 61%. In grilled fish, the bioaccessibility

values are slightly decreased, with a bioaccessible rate of EPA of 46% and DHA 43%. In the dietary supplement, the bioaccessibility rate of EPA was 54% and DHA 55%.

A daily recommended dose of raw seabream should attain 65 g for raw or 108 g of grilled fish in the primary prevention of cardiovascular disease, having into account the ISSFAL, 2004 recommendation of 500 mg of EPA+DHA fish. In the case of supplements 4 capsules of omega-3 should be taken daily.

The *in vitro* digestive model used is perfectly adapted to the matrix of the gilthead seabream, as was effective in the hydrolysis of TAG, leading to a dominant lipid class in the bioaccessible fraction: the FFA.

Concerning the supplement digestion, we found that not all TAG were hydrolysed at the end of the bioaccessibility trail showing a need to increase the effectiveness of this model in this matrix.

## Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ii</b>
<b>Extended Abstract .....</b>	<b>iii</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Valor nutricional do pescado.....	2
1.1.1 Humidade.....	3
1.1.2 Lípidos .....	3
1.1.2.1 Triacilgliceróis (TAG).....	4
1.1.2.2 Fosfolípidos (PL) .....	4
1.1.2.3 Colesterol (CH) .....	5
1.1.2.4 Ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados .....	6
1.2 Benefícios do consumo de pescado .....	7
1.3. Biologia e produção de dourada .....	9
1.4 Tratamentos culinários .....	12
1.5 Digestão e bioacessibilidade dos lípidos.....	12
1.5.1 Digestão dos lípidos .....	12
1.5.2 Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos lípidos.....	14
1.6. Objetivos .....	14
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>15</b>
2.1 Preparação das amostras e tratamentos culinários .....	15
2.2 Materiais utilizados e métodos analíticos.....	17
2.2.1 Extração da gordura inicial da dourada, crua e grelhada, e do suplemento alimentar.....	18
2.2.2 Digestão <i>in vitro</i> da dourada e do suplemento alimentar .....	19
2.2.3 Extração da gordura bioacessível da dourada, crua e grelhada, e do suplemento alimentar.....	21
2.2.4 Determinação das classes de lípidos por cromatografia em camada fina ( <i>thin layer chromatography – TLC</i> ).....	22
2.2.4.1 TLC analítica .....	22
2.2.4.2 TLC preparativa.....	24
<b>3. Apresentação e discussão dos resultados.....</b>	<b>26</b>
3.1 Dourada crua e grelhada .....	26
3.1.1 Composição química de dourada crua e grelhada.....	26
3.1.2 Perfil de ácidos gordos de dourada crua e grelhada.....	27
3.1.3 Perfis bioacessíveis totais de dourada crua e grelhada .....	29
3.1.4 Avaliação do modelo digestivo <i>in vitro</i> .....	30

---

3.1.5	Taxa de bioacessibilidade dos ácidos gordos de dourada crua e grelhada	32
3.1.6	Perfis de ácidos gordos, após digestão, de dourada crua e grelhada	34
3.2	Suplemento alimentar de ómega-3	36
3.2.1	Perfis de ácidos gordos do suplemento alimentar de ómega-3	36
3.2.2	Perfis bioacessíveis totais de suplemento alimentar de ómega-3	37
3.2.3	Avaliação do modelo digestivo <i>in vitro</i>	38
3.2.4	Taxa de bioacessibilidade dos ácidos gordos do suplemento alimentar de ómega-3	39
3.2.5	Perfis de ácidos gordos, após digestão, do suplemento alimentar	40
<b>4.</b>	<b>Considerações finais</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusão</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Perspetivas Futuras</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Fontes bibliográficas</b>	<b>47</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Representação de uma molécula de TAG .....	4
<b>Figura 2:</b> Representação de uma molécula de PL .....	5
<b>Figura 3:</b> Representação de uma molécula de CH .....	5
<b>Figura 4:</b> Representação de uma molécula de EPA .....	6
<b>Figura 5:</b> Evolução da captura anual de dourada .....	10
<b>Figura 6:</b> Evolução da produção anual de dourada de aquacultura .....	10
<b>Figura 7:</b> <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758) .....	11
<b>Figura 8:</b> Distribuição mundial de dourada selvagem .....	11
<b>Figura 9:</b> Esquema representativo do método de análise da fração lipídica bioacessível de dourada .....	17
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática da realização de uma TLC analítica .....	23
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática da realização de uma TLC preparativa .....	25
<b>Figura 12:</b> Classes de lípidos de dourada crua e grelhada, antes e após aplicação do modelo de digestão <i>in vitro</i> .....	31
<b>Figura 13:</b> Classes de lípidos do suplemento alimentar, antes e após aplicação do modelo de digestão <i>in vitro</i> .....	38
<b>Figura 14:</b> Esquema do consumo recomendado de dourada crua e grelhada, para assimilação de 500 mg de EPA+DHA .....	43
<b>Figura 15:</b> Esquema do consumo recomendado do suplemento alimentar, para assimilação de 500 mg de EPA+DHA .....	44

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Composição química média dos produtos da pesca .....	2
<b>Tabela 2:</b> Valor energético e composição química, por 100 g de parte edível de dourada .....	2
<b>Tabela 3:</b> Classificação do pescado em função do teor de gordura .....	3
<b>Tabela 4:</b> Material e reagentes para aplicação do método Smedes .....	18
<b>Tabela 5:</b> Material e reagentes para aplicação da catálise ácida .....	19
<b>Tabela 6:</b> Soluções e enzimas utilizadas na preparação dos sucos digestivos .....	20
<b>Tabela 7:</b> Material e reagentes para aplicação do método para extração de gordura bioacessível .....	21
<b>Tabela 8:</b> Material e reagentes para TLC analítica .....	23
<b>Tabela 9:</b> Material e reagentes para TLC preparativa .....	24
<b>Tabela 10:</b> Composição química, em percentagem, de dourada crua e grelhada.....	26
<b>Tabela 11:</b> Perfil de ácidos gordos (mg/100 g) de dourada crua e grelhada .....	27
<b>Tabela 12:</b> Ácidos gordos (mg/100 g) de dourada crua e grelhada .....	28
<b>Tabela 13:</b> Perfil de ácidos gordos bioacessíveis (mg/100 g) de dourada crua e grelhada .....	29
<b>Tabela 14:</b> Percentagens relativas de cada classe lipídica nas frações iniciais e bioacessíveis de dourada crua e grelhada .....	31
<b>Tabela 15:</b> Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis em dourada crua e grelhada .....	32
<b>Tabela 16:</b> Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis, para as diferentes classes de lípidos em dourada crua .....	34
<b>Tabela 17:</b> Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis, para as diferentes classes de lípidos em dourada grelhada .....	35
<b>Tabela 18:</b> Perfil de ácidos gordos (mg/cápsula) do suplemento alimentar .....	36
<b>Tabela 19:</b> Perfil de ácidos gordos bioacessíveis (mg/cápsula) do suplemento alimentar .....	37
<b>Tabela 20:</b> Percentagens relativas de cada classe lipídica na fração inicial e bioacessível do suplemento alimentar .....	38
<b>Tabela 21:</b> Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis no suplemento alimentar ..	40
<b>Tabela 22:</b> Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis, para as diferentes classes de lípidos no suplemento alimentar .....	41
<b>Tabela 23:</b> Perfil de ácidos gordos bioacessíveis (mg/100 g) de dourada crua inicial e dourada grelhada bioacessível .....	42

## Índice de anexos

<b>Anexo I:</b> Cromatograma e relatório de dourada crua inicial total .....	I
<b>Anexo II:</b> Cromatograma e relatório de dourada grelhada inicial .....	III
<b>Anexo III:</b> Cromatograma e relatório de dourada crua bioacessível .....	V
<b>Anexo IV:</b> Cromatograma e relatório de dourada grelhada bioacessível .....	VII
<b>Anexo V:</b> Cromatograma e relatório da fração FFA de dourada crua bioacessível .....	IX
<b>Anexo VI:</b> Cromatograma e relatório da fração DAG+CH de dourada crua bioacessível .....	XI
<b>Anexo VII:</b> Cromatograma e relatório da fração MAG de dourada crua bioacessível .....	XIII
<b>Anexo VIII:</b> Cromatograma e relatório da fração PL de dourada crua bioacessível .....	XV
<b>Anexo IX:</b> Cromatograma e relatório da fração FFA de dourada grelhada bioacessível .....	XVII
<b>Anexo X:</b> Cromatograma e relatório da fração DAG+CH de dourada grelhada bioacessível .....	XIX
<b>Anexo XI:</b> Cromatograma e relatório da fração MAG de dourada grelhada bioacessível .....	XXI
<b>Anexo XII:</b> Cromatograma e relatório da fração PL de dourada grelhada bioacessível .....	XXIII
<b>Anexo XIII:</b> Cromatograma e relatório do suplemento alimentar inicial .....	XXV
<b>Anexo XIV:</b> Cromatograma e relatório do suplemento alimentar bioacessível .....	XXVII
<b>Anexo XV:</b> Cromatograma e relatório da fração TAG do suplemento alimentar .....	XXIX
<b>Anexo XVI:</b> Cromatograma e relatório da fração FFA do suplemento alimentar .....	XXXI
<b>Anexo XVII:</b> Cromatograma e relatório da fração DAG+CH do suplemento alimentar .....	XXXIII
<b>Anexo XVIII:</b> Cromatograma e relatório da fração MAG do suplemento alimentar .....	XXXV

## Glossário de abreviaturas

De seguida listam-se as abreviaturas utilizadas ao longo desta dissertação, por ordem alfabética, seguidas do seu significado e da respetiva tradução. Optou-se por as manter na forma como são internacionalmente reconhecidas.

**CH** – *Cholesterol* (colesterol)

**DAG** – *Diacylglycerol* (diacilglicerol)

**DHA** – *Docosahexaenoic acid* (ácido docosahexaenóico), 22:6 $\omega$ 3

**EPA** – *Eicosapentaenoic acid* (ácido eicosapentaenóico), 20:5 $\omega$ 3

**FAO** – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

**FFA** – *Free fatty acids* (ácidos gordos livres)

**HDL** – *High-density lipoproteins* (lipoproteínas de alta densidade)

**INSARJ** – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**IPMA** – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

**ISSFAL** – *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*

**LDL** – *Low-density lipoproteins* (lipoproteínas de baixa densidade)

**MAG** – *Monoacylglycerol* (monoacilglicerol)

**PL** – *Phospholipids* (fosfolípidos)

**TAG** – *Triacylglycerol* (triacilglicerol)

**TLC** – *Thin layer chromatography* (cromatografia de camada fina)

## 1. Introdução

Certamente pela localização geográfica de Portugal, o povo português é por tradição uma comunidade piscatória, com marcados costumes no consumo de peixe confeccionado das mais variadas formas.

Até ao final do século XVIII, o peixe fresco era apenas acessível às populações do litoral e, ao interior, chegava peixe salgado ou seco. Já no século XX, e até meados deste, deu-se uma pequena evolução dos consumos de peixe, mas não muito significativa: a quantidade de peixe que chegava ao interior do país passou a ser mais abundante, consequência das melhorias ao nível dos transportes. No entanto, foi somente na década de 1960 que se deu a grande alteração no consumo de peixe, uma vez que começou a consumir-se peixe congelado <sup>(12)</sup>.

Após o aumento das atividades piscatórias descrito, até à década de 1980, foi a partir deste período que se deu um decréscimo acentuado. Por consequência da escassez de recursos de origem nacional, as necessidades passaram a ser satisfeitas através da importação de um grande número de espécies de pescado, das quais se destacam o bacalhau e a pescada, e da aquacultura. Esta forma de produção fornece essencialmente salmão, dourada e robalo <sup>(12)</sup>.

A tradição portuguesa do consumo de pescado conduz a que a FAO, no seu último relatório anual (elaborado a partir de dados de 2007), situe Portugal como o maior consumidor de produtos da pesca e aquacultura *per capita* nos 61,5 kg/ano <sup>(17)</sup>. Espera-se que este valor continue a aumentar, uma vez que, à medida que o conhecimento científico foi avançando, tornou-se mais claro que o pescado é benéfico para o bem-estar físico e mental.

Consequência do atual estilo de vida, as pessoas têm cada vez menos disponibilidade de tempo para preparar refeições demoradas, como é o caso da maioria das que incluem peixe. Assim, recorrem tanto a refeições já prontas, como a suplementos alimentares, bastante convenientes.

## 1.1 Valor nutricional do pescado

Os produtos da pesca apresentam valor nutricional semelhante ao da carne de mamíferos e aves. No entanto, como já foi referido, estes produtos têm a mais-valia de ser constituídos por compostos benéficos para a saúde. A composição bioquímica de cada espécie de peixe é relativamente diferente – tabela 1. Esta é influenciada pelo meio envolvente e pela alimentação, entre outros fatores.

**Tabela 1:** Composição química média dos produtos da pesca

Composição química média dos produtos da pesca (%)	
Humidade	50-85
Proteína	12-24
Gordura	0,1-22
Sais minerais	0,8-2,0
Glúcidos	<0,5

**Fonte:** *Produtos da Pesca: Valor Nutricional e Importância para a Saúde e Bem-estar dos Consumidores*, Publicações Avulsas do IPAMAR, 2008

No caso do pescado que cresce em aquacultura, é mais fácil controlar as variações na sua composição, através da manipulação do *habitat* e das rações. A composição química média da dourada encontra-se na tabela 2.

**Tabela 2:** Valor energético e composição química, por 100 g de parte edível de dourada

Valor energético (kcal) e composição química (g)						
Dourada	Energia	Água	Proteínas	Lípidos	Colesterol	Minerais
Crua	167	68,9	19,7	9,8	0,5	1,4
Grelhada	178	65,5	22,3	9,9	1,0	2,3

**Fonte:** *Tabela da Composição de Alimentos*, Instituto de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2007

### 1.1.1 Humidade

O músculo do pescado é fundamentalmente constituído por água, que varia entre 50 e 85%. A percentagem de água é inversamente proporcional à percentagem de lípidos, sendo, para a maioria das espécies, a soma destes dois constituintes igual a cerca de 80%. Ainda assim, este valor vai variando ao longo do ciclo de vida do peixe.

### 1.1.2 Lípidos

Na tabela 3 pode encontrar-se a classificação do pescado em função da percentagem de gordura, assim como alguns exemplos de cada classe.

**Tabela 3:** Classificação do pescado em função do teor de gordura

Classificação do pescado em função do teor de gordura			
Magro	Semi-gordo	Gordo	Muito gordo
< 2%	2-7%	7-15%	> 15%
Bacalhau, arinca, badejo, pescada	Solha/linguado, truta, atum, dourada	Arenque, espadilha, cavala, carapau, salmão, carpa	Enguia, sardinha

**Fonte:** *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*, CRC Press, 2002

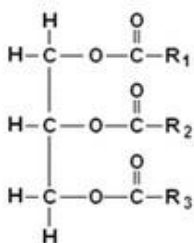
Os lípidos são substâncias naturais, constituídas por carbono, hidrogénio e oxigénio, formadas por ácidos gordos e ésteres ou compostos com ligação química a eles. As gorduras podem classificar-se em simples ou complexas. As gorduras simples são fundamentalmente ácidos gordos, glicerol e colesterol. Os lípidos complexos dividem-se em triacilgliceróis, ceras, esteróis, fosfolípidos e lipoproteínas.

De entre as importantes funções biológicas que os lípidos desempenham, destacam-se a reserva energética de elevado valor calórico, o transporte de vitaminas lipossolúveis, a formação de membranas celulares e manutenção da sua integridade estrutural e funcional, sinalização intra e intercelular e isolamento térmico e elétrico.

### 1.1.2.1 Triacilgliceróis (TAG)

Os triacilgliceróis (TAG), são compostos não polares, pois as regiões polares dos seus precursores estão agora ligadas a ácidos gordos, formando ésteres. São, por isso, moléculas muito hidrofóbicas. São insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como éter e clorofórmio.

As moléculas de TAG, figura 1, são formadas por 90-92 % de ácidos gordos e 8-10 % de glicerol, pelo que quando são hidrolisadas, degradam-se nestes dois tipos de compostos. Os ácidos gordos, produto da hidrólise, são transportados pela albumina pela corrente sanguínea e ficam disponíveis para as células os usarem como fonte energética.

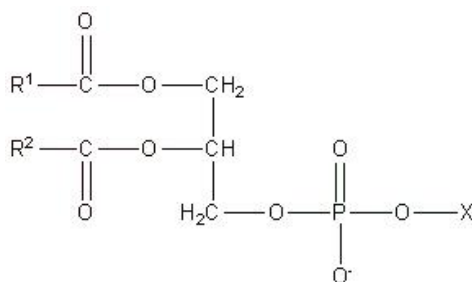


**Figura 1:** Representação de uma molécula de TAG

### 1.1.2.2 Fosfolípidos (PL)

Os fosfolípidos, figura 2, são constituídos por uma molécula de glicerol, uma ou duas cadeias de ácidos gordos, um ou dois grupos fosfato e uma molécula polar ligada a ele. São moléculas anfipáticas – possuem uma cabeça hidrofílica constituída pelo grupo fosfato e uma cauda hidrofóbica, formada pelas cadeias de ácidos gordos. Esta é a característica que lhes permite desempenhar de forma tão eficaz a função de constituintes da membrana celular, estabelecendo a interface entre os meios intra e extracelular. Estes lípidos têm especial destaque nas espécies magras, uma vez que as gorduras que as constituem são essencialmente estruturais.

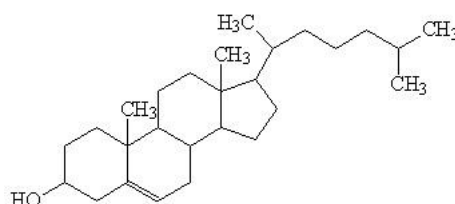




**Figura 2:** Representação de uma molécula de PL

### 1.1.2.3 Colesterol (CH)

O colesterol, figura 3, é um álcool policíclico de cadeia longa, encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo. É um componente essencial das membranas celulares dos mamíferos e o principal esteroide sintetizado pelos animais.



**Figura 3:** Representação de uma molécula de CH

Ainda que a maior parte do colesterol presente no corpo seja sintetizada pelo próprio organismo, existe uma pequena parte adquirida pela dieta. O colesterol é mais abundante nos tecidos que mais o sintetizam ou têm maior número de membranas agrupadas, como o fígado, medula espinhal, cérebro e placas ateromatosas das artérias.

O colesterol é necessário para o funcionamento normal da membrana plasmática das células dos mamíferos. É sintetizado no retículo endoplasmático das células ou provém da dieta. Quando ingerido, é transportado, por via sanguínea, pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *low density lipoproteins*) e é incorporado pelas células, através de endocitose, e hidrolisado nos lisossomas. Apesar desta função vital, o colesterol acaba por ser sempre associado às doenças cardiovasculares, às lipoproteínas que o transportam e à sua elevada concentração no sangue.

Sendo não hidrossolúvel, o colesterol é também insolúvel no sangue. Para ser transportado através da corrente sanguínea, liga-se a diversos tipos de lipoproteínas, partículas esféricas que têm, sua superfície exterior, principalmente proteínas hidrossolúveis. Existem vários tipos de lipoproteínas, que são classificadas de acordo com a sua densidade. Para perceber se os níveis de colesterol no sangue são os adequados, os analistas clínicos recorrem principalmente a duas lipoproteínas:

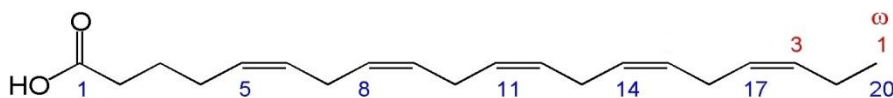
⇒ Lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *low density lipoproteins*): transportam o colesterol do fígado até outras células e tecidos, onde acaba por intervir na regulação e síntese do mesmo. Nos últimos anos, o termo "colesterol mau" tem sido usado para o LDL, que se acredita ter um papel preponderante na formação de placas ateroscleróticas, nos vasos sanguíneos.

⇒ Lipoproteínas de alta densidade (HDL – *high density lipoproteins*): pensa-se que têm capacidade para remover moléculas de colesterol depositadas nas paredes das artérias, levando-o de volta ao fígado, onde pode ser catabolizado.

#### 1.1.2.4 Ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados

Os ácidos gordos são compostos orgânicos simples, constituídos por carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O). Cada molécula tem, no extremo da cadeia, um grupo carboxílico que lhe confere carácter ácido e, no extremo oposto, apresenta um grupo metilo não funcional. São classificados de acordo com o comprimento da cadeia de carbonos, número, posição e configuração das duplas ligações e por insaturações.

Tomando como exemplo o EPA (C20:5 $\omega$ 3), na figura 4, 20 indica que a molécula tem 20 átomos C, 5 são as cinco ligações duplas do ácido gordo e 3 refere-se ao carbono, a partir do grupo metilo terminal, onde se encontra a primeira ligação dupla. Para os ácidos gordos polinsaturados, as restantes ligações duplas estão separadas por pontes metilénicas.



**Figura 4:** Representação de uma molécula de EPA

Relativamente ao seu grau de insaturação, os ácidos gordos podem ser distribuídos por três grupos: saturados, habitualmente conotados como gorduras prejudiciais à saúde, monoinsaturados e polinsaturados. Os ácidos gordos insaturados são geralmente líquidos, à temperatura ambiente. Em oposição, à mesma temperatura, os ácidos gordos saturados são sólidos. A nível estrutural, a grande diferença entre ácidos gordos insaturados e saturados pretende-se com o facto de as moléculas destes últimos não possuírem nenhuma ligação dupla, ao contrário das moléculas dos ácidos gordos monoinsaturados, que possuem uma, e dos polinsaturados, que possuem duas ou mais.

Os ácidos gordos polinsaturados desempenham papéis essenciais na resposta à infeção, são essenciais no crescimento e desenvolvimento do nosso organismo e na produção de metabolitos essenciais que contribuem de modo decisivo para a modelação da resposta cardiovascular. No seu conjunto, estes ácidos são considerados essenciais, porque o organismo humano não consegue sintetiza-los ou não os sintetiza em quantidade suficiente, por isso têm que ser fornecidos pelo regime alimentar.

## **1.2 Benefícios do consumo de pescado**

Estudos demonstram que o aparecimento e progressão de doenças cardiovasculares está relacionado com causas como fatores genéticos e estilo de vida. Os cientistas comprovam ainda que o aumento do consumo de pescado e produtos do mar diminui o risco de morte precoce, provocada por enfarte do miocárdio. A conclusão tirada nestes estudos é que consumos semanais de uma ou mais refeições à base de pescado resultam em decréscimo do risco de doença cardiovascular. Este efeito benéfico é diretamente proporcional ao teor de gordura do peixe e, consequentemente, à proporção de ácidos gordos presentes.

A aterosclerose consiste na acumulação progressiva de depósitos de substâncias gordas – lípidos – e de tecido fibroso nas paredes interna e média das artérias, formando trombos que resultam em espessamento e bloqueio. Em consequência, ocorre diminuição gradual do fluxo sanguíneo, que pode levar à interrupção da sua passagem. Em casos extremos, pode resultar em enfarte do miocárdio. Sabe-se que os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 presentes na gordura do peixe têm propriedades anti-aterogénicas e anti-trombóticas.

Também, na diminuição da tensão arterial, os ácidos gordos ómega-3 desempenham papel fundamental. Estudos recentes mostram que, em situações graves, em que os

doentes corriam perigo de vida, os ómegas-3 contribuíram para a normalização da tensão arterial.

Para obesos hipertensos, a incorporação de pescado e produtos da pesca na dieta, com o objetivo primário de reduzir o peso, resultou também no decréscimo da tensão arterial e do ritmo cardíaco.

Como os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 têm propriedades anti-inflamatórias, são aplicados, com sucesso, no tratamento de doenças reumáticas inflamatórias como a artrite reumatoide. As suas propriedades anti-inflamatórias podem também auxiliar no controlo da asma, doença inflamatória crónica que afeta as vias aéreas

Alimentos como carnes vermelhas, frutas e bebidas alcoólicas são frequentemente associados ao aparecimento de cancros. Ainda assim, investigações recentes mostram que o consumo de EPA e DHA está relacionado com uma diminuição significativa de cancro intestinal, da mama e próstata.

Segundo a *American Heart Association* <sup>(7)</sup> devem incluir-se pelo menos duas refeições semanais de peixe gordo, rico em ácidos gordos polinsaturados ómega-3, e, aos portadores de doença coronária, um consumo diário igual ou superior a 1 g de ómega-3, especialmente EPA e DHA.

Muito provavelmente, na sequência de todos os conselhos que a população recebe diariamente no sentido de consumir mais peixe e produtos da pesca, verificou-se um acréscimo no seu consumo anual. Torna-se, assim, fundamental fazer um esforço por compreender quais os benefícios que este alimento promove, não só nos adultos, mas também nas crianças ou em grupos específicos, como as grávidas.

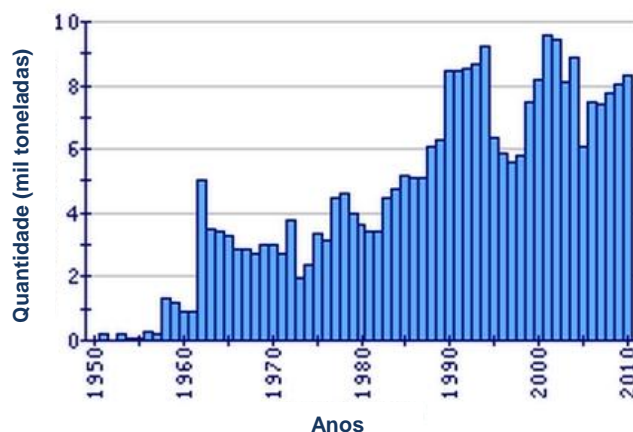
Nas grávidas, o consumo de peixe pode prevenir anomalias cardiometabólicas, como obesidade, diabetes tipo 2 e hipertensão. Um estudo publicado no *American Journal of Clinical Nutrition*, conclui que as grávidas devem incluir, de forma abundante, pescado na sua dieta, garantindo ao recém-nascido um melhor desenvolvimento, tanto físico como mental. Os autores do estudo são investigadores da Faculdade de Medicina Harvard, nos Estados Unidos, em parceria com cientistas do Instituto Statens Serum, da Dinamarca. Juntos, acompanharam mais de 25 mil crianças com idades compreendidas entre os 6 e os 18 meses. As conclusões basearam-se nas respostas que as mães dos bebés deram relativas ao desenvolvimento físico e cognitivo dos seus filhos, quando questionadas, por

exemplo, sobre a capacidade para manter o corpo direito sem esforço, resposta a estímulos sonoros ou ainda sobre a capacidade de beber água de um copo. A par das várias aptidões relatadas, foi feito um relatório detalhado acerca da dieta que as grávidas faziam antes do parto. Assim, conseguiram demonstrar que os filhos das mulheres que comiam aproximadamente 60 g de peixe por dia, durante a gestação, apresentavam desenvolvimento cerca de 25% maior, aos 6 meses, e quase 30% maior, aos 18 meses, quando comparadas com crianças, cujas mães ingeriram menor quantidade de peixe, aquando da gravidez.

Os neurónios e os fotorrecetores da retina, pertencentes ao sistema nervoso, são ricos em ácidos gordos ómega-3. Insuficiência da ingestão destes compostos durante o período pós-natal, sobretudo de DHA, associa-se a um deficiente desenvolvimento neurológico, quer a nível cognitivo, quer da função visual. Além disso, em idade mais avançada, os ómega-3 podem prevenir o declínio cognitivo, associado à demência, doença de Alzheimer e esclerose múltipla. O cérebro humano depende muito do DHA: níveis baixos de DHA têm sido vinculados à depressão, esquizofrenia, perda de memória e maior probabilidade de desenvolver Alzheimer. Comer peixe, duas vezes por semana, reduz em 28% o risco de demência e em 41% o risco de doença de Alzheimer, comparativamente a idosos que consomem pescado menos de uma vez por mês.

### **1.3. Biologia e produção de dourada**

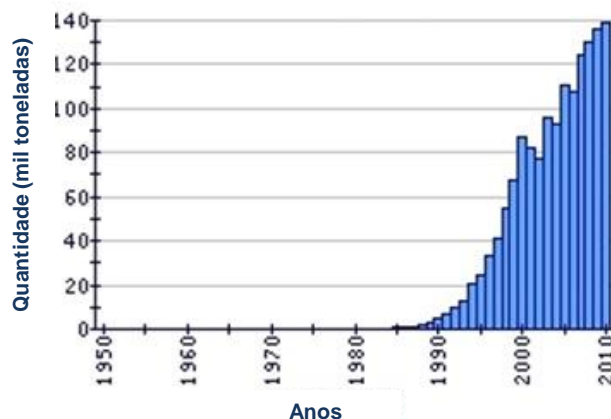
Segundo a FAO, o consumo mundial de dourada tem aumentado desde a década de 60, mantendo-se constante até ao final da década de 80. Durante a década de 90, é possível observar, na figura 5, que houve um pico de consumo desta espécie, chegando a ser capturadas cerca de 9000 toneladas, por ano.



**Figura 5:** Evolução da captura anual de dourada

**Fonte:** *FAO Fishery Statistics*

O acentuado crescimento populacional, a par do aumento da preferência por dourada, tornou os recursos naturais de pescado e produtos da pesca insuficientes para responder às necessidades. Surge, assim, a aquacultura na década de 80, mas é já nos anos 90 que começa a ter expressão. Entre 2000 e 2010, atinge os seus valores mais elevados de produção (cerca de 140 000 toneladas de dourada, por ano) – figura 6.



**Figura 6:** Evolução da produção anual de dourada de aquacultura

**Fonte:** *FAO Fishery Statistics*

A dourada é de uma espécie pertencente à família *Sparidae*, cujo nome científico é *Spondylisoma cantharus*, da espécie *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). Deve o seu nome à lista de cor dourada que apresenta na cabeça, entre os olhos. Tem o corpo todo coberto por escamas, é lateralmente comprido, de dorso alto, cabeça pequena, relativamente ao resto do corpo, boca pequena, nariz curto e olhos grandes. As suas barbatanas são muito

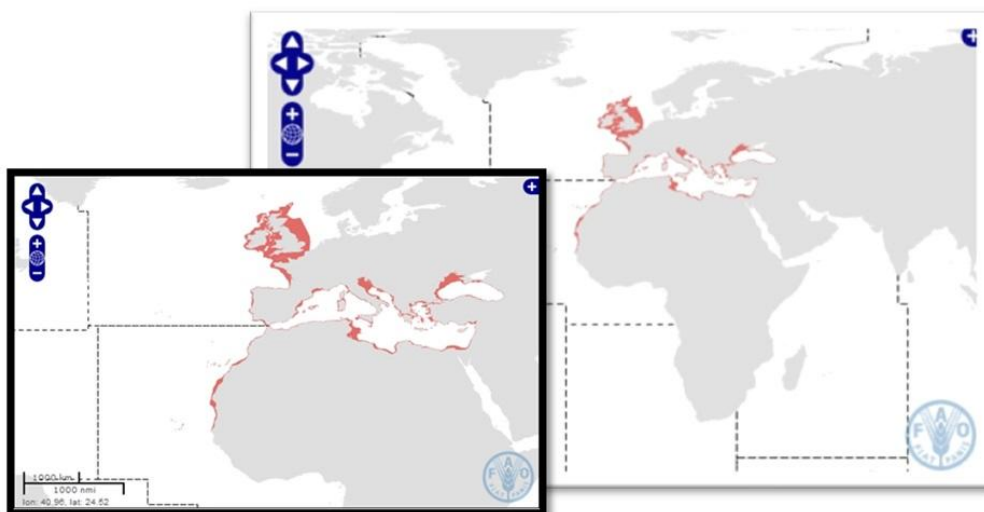
desenvolvidas e espinhosas, com cor entre o cinzento e o azul no dorso, no abdómen predomina o prateado, como é possível observar pela figura 7.



**Figura 7:** *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)

**Fonte:** *FAO Fishery Statistics*

A dourada selvagem é muito vulgar nas águas portuguesas. Distribui-se, em pequenos cardumes, pelo Atlântico, desde as ilhas Britânicas até Cabo Verde, incluindo as Canárias e Mar Mediterrâneo, podendo aparecer também no Mar Negro – figura 8. Esta espécie anda normalmente junto à costa, em águas pouco profundas (entre 25 e 30 metros), ainda que possa ser encontrada até 150 metros de profundidade <sup>(8)</sup>.



**Figura 8:** Distribuição mundial de dourada selvagem

**Fonte:** *FAO Fishery Statistic*

Os indivíduos desta espécie são hermafroditas. A maioria começa por ser do sexo masculino, tornando-se fêmeas, posteriormente. A desova ocorre de Outubro a Dezembro. Os machos atingem a maturidade em 1-2 anos (20-30 cm) e as fêmeas em 2-3 anos (33-40 cm). São principalmente carnívoros, pois alimentam-se de moluscos, crustáceos e peixes, mas poderão também ser herbívoros, na ausência de alimento preferencial <sup>(8)</sup>.

## 1.4 Tratamentos culinários

Em Portugal é pouco usual consumir peixe cru, pelo que há que ter em consideração que os tratamentos culinários influenciam a bioacessibilidade dos nutrientes. Existem vários tratamentos culinários que podem aplicar-se aos alimentos, preparando-os para ingestão. Estes podem ser mais ou menos agressivos, alterando a matriz original, conforme as condições escolhidas.

O processamento mais comum para a dourada é a grelhagem e é também um dos tratamentos culinários mais drásticos. Segundo Moradi *et al.*, 2011 <sup>(11)</sup>, grelhar é um método em que o calor é seco, conduzido por ar seco. As principais alterações provocadas por este processo são a perda significativa de água, desnaturação proteica e diminuição do teor lipídico total.

Os ácidos gordos são mais estáveis ao calor, quanto menor for o seu grau de insaturação, pelo que os polinsaturados de cadeia longa, principalmente o EPA e o DHA, são bastante suscetíveis à oxidação, pelo que o seu teor pode diminuir com os tratamentos culinários <sup>(14)</sup>.

## 1.5 Digestão e bioacessibilidade dos lípidos

Segundo Ferreira, 1983 <sup>(9)</sup>, a digestão inicia-se na boca e é o conjunto de ações sofridas pelos alimentos no tubo digestivo, que conduzem à degradação dos glúcidos, lípidos e proteínas, em partículas suficientemente pequenas para passarem através da parede intestinal e entrarem na corrente sanguínea. As enzimas, constituintes dos sucos digestivos, decompõem as macromoléculas em moléculas mais simples: os glúcidos complexos convertem-se em glúcidos simples, os lípidos originam ácidos gordos e glicerol e as proteínas subdividem-se nas suas unidades básicas: os aminoácidos.

### 1.5.1 Digestão dos lípidos

Quando mais baixo for o ponto de fusão de uma gordura, mais fácil será a sua digestão.



A digestão dos lípidos inicia-se na boca, com as ações mecânicas e de ensalivação, não sendo observáveis modificações de ordem digestiva, nesta primeira fase. No estômago, inicia-se a emulsão, provocada pelos movimentos e pelo suco gástrico. No duodeno (intestino delgado), o quimo ácido desencadeia secreções pancreáticas, biliares e intestinais.

O desencadeamento da secreção pancreática é essencialmente hormonal. Para além do ácido clorídrico, a libertação desta secreção também pode ser estimulada por outros fatores, como a presença de extratos de carne e ácidos gordos. A secreção pancreática contém enzimas ativas para todos os alimentos, como a lipase, que vão aumentando proporcionalmente à quantidade de cada tipo de alimento (glúcidos, lípidos e proteínas).

A lipase pancreática hidrolisa os triacilgliceróis, separando progressivamente os ácidos gordos do glicerol. No entanto, a separação pode não ser completa, podendo os TAG degradar-se em MAG (monoacilgliceróis) e DAG (diacilgliceróis), que coexistem com os ácidos gordos já separados do glicerol. Os ácidos gordos de cadeia curta são os que se hidrolisam mais facilmente. A par da lipase, existe a fosfolipase A<sub>2</sub>, que hidrolisa os fosfolípidos na ligação 2 do éster.

O fígado produz, de forma contínua, bÍlis, que envia para a vesícula biliar, onde é armazenada. O desencadeamento da secreção da bÍlis, a partir da vesícula, para que entre no processo digestivo, é feito pelas gorduras que chegam ao duodeno, ainda que a estimulação da sua contração seja hormonal. A bÍlis é constituída essencialmente por bilirrubina, colesterol e sais biliares. A bilirrubina deriva da hemoglobina, depois de perder o ferro. Os sais biliares têm grande capacidade de emulsão, dividindo as moléculas dos lípidos por forma a constituírem micelas. Estas micelas têm grande superfície de contacto com o ambiente onde estão as lípases pancreáticas e intestinais.

A lipase intestinal é produzida em menor quantidade e é insuficiente para substituir a lipase pancreática, pelo que na ausência da mesma, cerca de metade da gordura ingerida não é hidrolisada, acabando por ser excretada através das fezes. Já no intestino, existe também uma fosfolipase.

### **1.5.2 Bioaccessibilidade e biodisponibilidade dos lípidos**

Após o processo digestivo descrito, a gordura encontra-se pronta para ser absorvida, sob a forma de ácidos gordos livres e glicerol. Esta matriz lipídica resultante da digestão constitui a fração bioacessível do alimento que foi ingerido, isto é, trata-se da quantidade de nutrientes que se encontra disponível para ser absorvida pelo organismo.

A mistura de ácidos gordos deixa a fase oleosa da emulsão em que se encontrava na parte inicial do intestino delgado e difunde-se para o interior de micelas mistas, solúveis em água. Estas micelas são o meio de transporte dos produtos da digestão até ao interior das células das vilosidades. Assim, a quantidade de nutrientes que é realmente absorvida pelo organismo corresponde à fração biodisponível.

Grande parte da gordura ingerida passa para o interior dos enterócitos (células epiteliais da camada superior do intestino, com capacidade de quebrar moléculas e transportá-las para dentro dos tecidos). Uma vez nos enterócitos, são transformadas em TAG neutros, que são posteriormente envolvidos por uma camada proteica completada por ésteres de colesterol e fosfolípidos, constituindo os quilomícrons. Estes constituintes têm a capacidade de passar para os vasos linfáticos da região abdominal, de onde acabam por migrar para a circulação sanguínea, através do canal torácico.

### **1.6. Objetivos**

Considerando que, ao longo do processo digestivo, os lípidos vão sofrendo alterações as questões a que este trabalho pretende responder são:

- ✓ Qual é o efeito do tratamento culinário nos ácidos gordos ómega-3 da dourada?
- ✓ Que alterações sofreu o perfil de ácidos gordos no final do processo digestivo, na dourada e no suplemento alimentar?
- ✓ Qual é a eficácia do modelo digestivo *in vitro*, na dourada e no suplemento alimentar?

## 2. Materiais e métodos

Esta tese, inserida no projeto *GoodFish*, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P./IPMA, tem como objeto de análise a dourada. De acordo com um inquérito realizado a nível nacional, é um dos peixes preferidos pelos portugueses. Irá fazer-se comparação entre o alimento em cru e grelhado, visto que este, para além de ser o tratamento culinário mais usual é, também, o mais extremo. Os indivíduos de dourada foram fornecidos pelo IPMA, que adquiriu 9 peixes de aquacultura, de Vila do Conde, divididos em 3 *pools*.

Devido à sua pertinência, estudar-se-á também a bioacessibilidade de ácidos gordos ómega-3 num suplemento alimentar de óleo de peixe. O suplemento selecionado apresenta-se sob a forma de cápsulas de gel, acondicionadas em embalagem opaca de 100 unidades. A sua composição genérica é gelatina, glicerina e água.

De acordo com a informação presente na bula do suplemento, cada cápsula contém 1000 mg de óleo de peixe (arenque, anchova, cavala, sardinha e salmão), dos quais 180 mg são de EPA e 120 mg são de DHA.

O óleo de peixe, contido nas cápsulas, provém principalmente de 9 subespécies de sardinha, 8 subespécies de anchova e cavala. O salmão (8 subespécies) é utilizado para aumentar a concentração de DHA e o arenque (entre 6 e 11 subespécies) é usado para aumentar o nível de EPA. Todas as espécies, usadas na elaboração deste suplemento, são pescadas em canais profundos de água fria, da região norte do Oceano Atlântico e no Oceano Pacífico e nenhuma delas se encontra em risco de vias de extinção. A gordura é extraída principalmente do músculo do peixe.

### 2.1 Preparação das amostras e tratamentos culinários

Para proceder ao tratamento culinário, lavou-se, descabeçou-se e eviscerou-se o peixe. Posteriormente, usou-se apenas sal para temperar (1,5 g de sal por cada 100 g de filete de dourada). Cada peixe foi dividido ao meio para que a comparação dos resultados fosse rigorosa. Metade foi analisada crua e a outra metade foi sujeita ao calor da grelha. Foi utilizado um grelhador doméstico da Flama com 2000 W de potência e aplicou-se o processamento térmico durante cerca de 10 minutos (5 de cada lado do filete).

Para preparar as amostras, removeram-se as espinhas e a pele, conservando apenas o músculo, que foi homogeneizado para ser congelado a -20 °C, até à realização das análises.

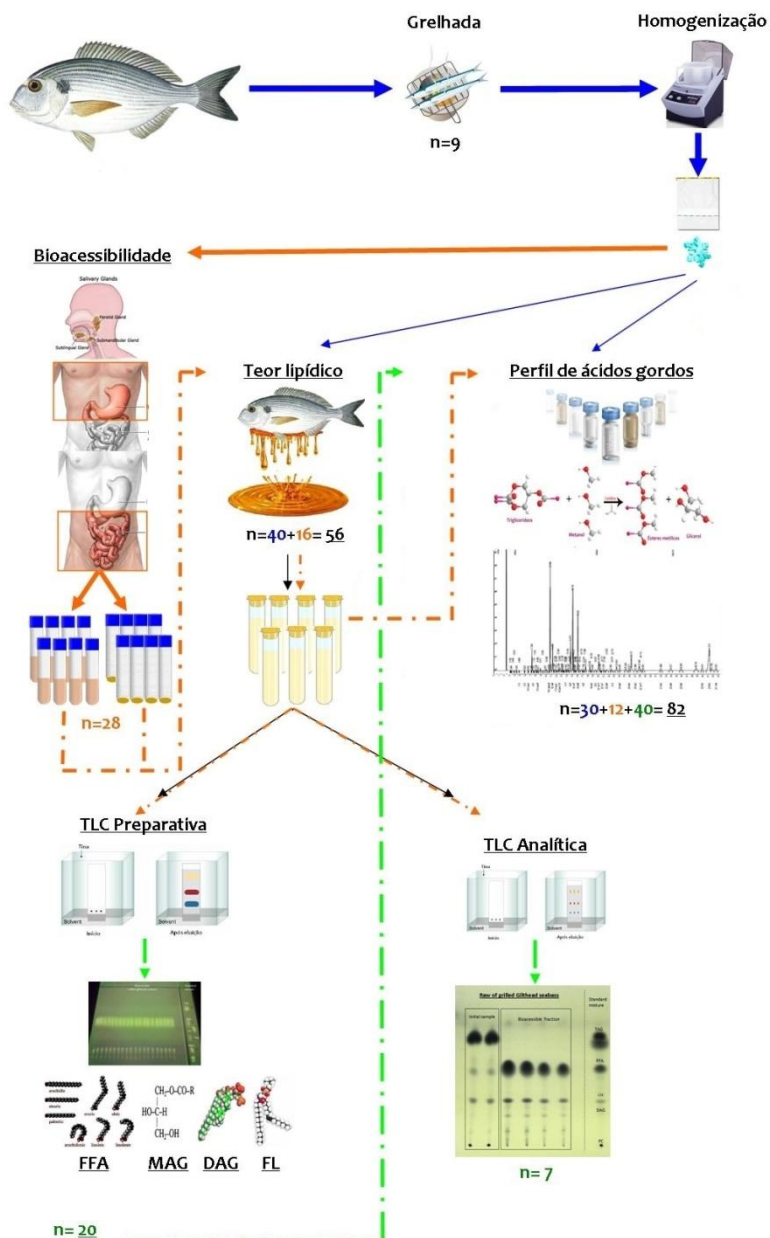
Para analisar o perfil de ácidos gordos, as amostras foram liofilizadas durante 48 horas, a -45 °C e cerca de  $10^{-1}$  atm, e novamente homogeneizadas. No caso de não serem imediatamente alvo de ensaio, estas últimas amostras são novamente armazenadas a -20 °C. No entanto, para a maioria dos procedimentos, é utilizada amostra húmida.

Parte destas amostras liofilizadas foram submetidas a ensaio de bioacessibilidade, de acordo com o método *in vitro* descrito por Versantvoort *et al.*, 2004 <sup>(19)</sup>, por forma a obter a fração bioacessível.

O delineamento passou pela extração dos lípidos totais das amostras cruas (para comparação) e das amostras grelhadas, em ambos os casos, antes e depois da digestão *in vitro*. Determinaram-se as diferentes classes lipídicas, separando a fração polar da não polar. Para a obtenção dos resultados, os lípidos extraídos foram sujeitos a análise cromatográfica para determinação do perfil de ácidos gordos. Todo o método está esquematizado, de forma resumida, na figura 9.

É de ressaltar que para analisar o suplemento alimentar, procedeu-se de forma semelhante à do peixe. As diferenças incidem no facto deste composto não ser sujeito a tratamento culinário. No entanto, é analisado o seu perfil lipídico, tal como é fornecido na embalagem e, também, após ser submetido a ensaio de bioacessibilidade.

Para analisar o perfil inicial de ácidos gordos do suplemento alimentar de ómega-3, abriu-se uma cápsula do mesmo, de onde se tirou 1 g de óleo. Desse óleo, por extração, obteve-se cerca de 0,73 g de gordura, que, após catálise, foi injetada no cromatógrafo de fase gasosa.



**Figura 9:** Esquema representativo do método de análise da fração lipídica bioacessível de dourada

## 2.2 Materiais utilizados e métodos analíticos

Tomando como ponto de partida a figura 9, neste capítulo será pormenorizado todo o processo de análise de ácidos gordos ómega-3 na dourada e no suplemento alimentar.

### 2.2.1 Extração da gordura inicial da dourada, crua e grelhada, e do suplemento alimentar

Para extrair a gordura total das amostras de dourada foi seguido o método de Smedes, 1999 <sup>(16)</sup>, elaborado a partir do método Bligh & Dyer, 1959 <sup>(3)</sup>. Trata-se de uma metodologia que recorre a um solvente polar não-clorado e de baixa toxicidade. Os materiais e reagentes utilizados estão enumerados na tabela 4.

**Tabela 4:** Material e reagentes para aplicação do método Smedes

Material e reagentes para aplicação do método Smedes		
<b>Material</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Estufa</li> <li>o Tubos de centrífuga de 100 mL</li> <li>o Centrífuga</li> <li>o Papel de filtro <i>Whatman n° 1</i></li> <li>o Balança de precisão 0,001 g</li> <li>o Pipetas de <i>Pasteur</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o <i>Polytron</i></li> <li>o Copos de vidro</li> <li>o Balões-pêra de evaporação</li> <li>o Evaporador rotativo e bomba de vácuo</li> <li>o Vortéx</li> </ul>
<b>Reagentes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Ciclohexano</li> <li>o Isopropanol</li> <li>o Sulfato de sódio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Água ultra pura <i>Milli-Q Plus Millipore</i></li> <li>o Solução de isopropanol em ciclohexano, a 13%</li> </ul>

Colocaram-se os balões-pêra em estufa, a 105 °C, durante 1 hora, para registar as suas massas. De seguida, pesaram-se as amostras e adicionou-se o isopropanol e o ciclohexano, homogeneizando no *polytron*, durante 2 minutos. Adicionou-se a água Milli-Q e homogeneizou-se no vortéx mais 1 minuto. Esta mistura foi centrifugada a 2000 rpm, durante 5 minutos. A fase orgânica (superior) foi transferida para um balão-pêra e, à amostra, acrescentou-se solução de isopropanol em ciclohexano, a 13%, para nova extração. Procedeu-se da mesma forma, homogeneizando, centrifugando e transferindo a fase orgânica para um balão-pêra, filtrando por meio de um funil, papel de filtro e sulfato de sódio anidro.

A gordura dissolvida que se obteve no balão-pêra foi sujeita a evaporação num evaporador rotativo com bomba de vácuo. Para garantir que todo o solvente foi evaporado, secou-se a gordura com corrente de azoto e pesou-se, calculando a massa de gordura.

A gordura obtida pelo método Smedes foi posteriormente utilizada para realização de cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography – TLC*), com objetivo de ver a

proporção relativa das várias frações lipídicas, na dourada, antes dos ensaios de bioacessibilidade, ou seja, caracterização do alimento antes de ser digerido.

Para obtenção do perfil lipídico das amostras iniciais de dourada, crua e grelhada, e do suplemento alimentar realizou-se catálise ácida, para a qual se utilizaram os materiais e os reagentes que constam da tabela 5. Esta reação permite preparar os ésteres metílicos para serem lidos pelo cromatógrafo de fase gasosa.

**Tabela 5:** Material e reagentes para aplicação de catálise ácida

Material e reagentes para aplicação de catálise ácida		
<b>Material</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Balança de precisão 0,001 g</li> <li>○ Tubos de vidro de 15 mL, com rosca</li> <li>○ Vortéx</li> <li>○ Banho</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pipetas de <i>Pasteur</i></li> <li>○ Centrífuga</li> <li>○ Coluna de filtração e algodão</li> <li>○ Viais</li> </ul>
<b>Reagentes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Solução de cloreto de acetilo/metanol, a 5%</li> <li>○ Sulfato de sódio anidro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Água ultra pura <i>Milli-Q Plus Millipore</i></li> <li>○ N-heptano</li> </ul>

Colocou-se amostra, peixe ou o conteúdo de uma cápsula de suplemento alimentar, nos tubos de vidro e adicionou-se a solução cloreto de acetilo/metanol, que foram agitados no vortéx, durante cerca de 30 segundos. Foram posteriormente postos num banho a 80 °C, durante 1 hora. Após este tempo, retiraram-se do banho, arrefeceram à temperatura ambiente e foi acrescentado, a cada um, água *Milli-Q* e n-heptano. Centrifugaram-se, durante 5 minutos, a 2000xg, e filtrou-se a fase orgânica (superior) para viais, por meio de colunas de filtração com algodão e sulfato de sódio anidro. As amostras foram assim preparadas para injeção num cromatógrafo de fase gasosa, obtendo-se o perfil lipídico inicial, antes dos ensaios de bioacessibilidade.

### 2.2.2 Digestão *in vitro* da dourada e do suplemento alimentar

Versantvoort *et al.*, 2004 <sup>(19)</sup>, tal como já foi referido, descreveu um modelo de digestão *in vitro* que tem vindo a ser utilizado para extrair as frações bioacessíveis dos nutrientes. Foi este o método seguido para extrair a gordura bioacessível da dourada e do suplemento alimentar. Para tal, prepararam-se em laboratório os sucos digestivos que têm papel relevante no processo digestivo humano. A sua preparação pode ser compreendida na

tabela 6. Todos os sucos digestivos foram preparados de forma a cumprir os valores de pH adequados e adicionados a 37 °C, para simular o melhor possível as condições humanas.

**Tabela 6:** Soluções e enzimas utilizadas na preparação dos sucos digestivos

Soluções e enzimas		Saliva (50 mL)	Suco gástrico (100 mL)	Suco duodenal (100 mL)	Suco biliar (50 mL)
Soluções inorgânicas	KCl (89,6 g/L)	10 mL	9,2 mL	6,3 mL	4,2 mL
	KSCN (20 g/L)	10 mL	-	-	-
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88,8 g/L)	10 mL	3,0 mL	-	-
	NaSO <sub>4</sub> (57 g/L)	10 mL	-	-	-
	NaCl (175,3 g/L)	1,7 mL	15,7 mL	40 mL	30 mL
	NaHCO <sub>3</sub> (84,7 g/L)	20 mL	-	40 mL	68,3 mL
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (22,2 g/L)	-	18 mL	9 mL	10 mL
	NH <sub>4</sub> Cl (30,6 g/L)	-	10 mL	-	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (8 g/L)	-	-	10 mL	-
	MgCl <sub>2</sub> (5 g/L)	-	-	10 mL	-
	HCl 37% g/g	-	6,5 mL	180 µL	150 µL
Soluções orgânicas	Ureia (25 g/L)	8 mL	3,4 mL	4 mL	10 mL
	Ácido glucorónico (2 g/L)	-	10 mL	-	-
	Glucose (65 g/L)	-	10 mL	-	-
	Hidrocloreto de glucosamina (33 g/L)	-	10 mL	-	-
Enzimas	α-amilase	290 mg	-	-	-
	Ácido úrico	15 mg	-	-	-
	Mucina	25 mg	3 g	-	-
	BSA	-	1 g	1 g	1,8 g
	Pepsina	-	2,5 g	-	-
	Pancreatina	-	-	9 g	-
	Lipase	-	-	1,5 g	-
	Bilis	-	-	-	30 g
Intervalo de pH ideal		6,8±0,2	1,30±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

O processo digestivo laboratorial iniciou-se pela adição de saliva à amostra ou à cápsula, tendo ficado a incubar durante 15 minutos. De seguida, juntou-se a solução de suco gástrico e deixaram-se os tubos em rotação, a 37 °C, durante 2 horas, simulando, desta forma, a digestão no estômago. Por fim, para reproduzir o processo no trato intestinal, adicionaram-se em simultâneo os sucos duodenal e biliar, bem como uma solução de bicarbonato, e coloca-se por mais 2 horas em rotação, a 37 °C.

No final da digestão *in vitro*, os tubos foram centrifugados, durante 5 minutos, a 2750 g e separaram-se a fase aquosa da fase orgânica. A fase aquosa, que é absorvida pelo intestino, ou seja, trata-se da fração bioacessível, e o *pellet*, que é sólido e portanto não absorvido pelo epitélio intestinal.



### 2.2.3 Extração da gordura bioaccessível da dourada, crua e grelhada, e do suplemento alimentar

Para extrair a fração de gordura das amostras não digeridas, dourada e suplemento alimentar, usou-se o método descrito por Bligh & Dyer, 1959 <sup>(3)</sup>.

Na extração de gordura bioaccessível da dourada crua e grelhada, e do suplemento alimentar, seguiu-se um método adaptado, baseado no descrito por Bligh & Dyer, 1959 <sup>(3)</sup> e utilizando os reagentes e materiais que constam da tabela 7.

**Tabela 7:** Material e reagentes para aplicação do método para extração de gordura bioaccessível

Material e reagentes para aplicação do método para extração de gordura bioaccessível		
Material	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Papel de filtro <i>Whatman n° 1</i></li> <li>○ Balança de precisão 0,001 g</li> <li>○ Tubos de vidro com rolha</li> <li>○ Funis de vidro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Vortex</li> <li>○ Balões-pêra</li> <li>○ Evaporador rotativo e bomba de vácuo</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Clorofórmio puro</li> <li>○ Sulfato de sódio anidro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Água ultra pura <i>Milli-Q Plus Millipore</i></li> </ul>

A cada tubo de bioaccessível, adicionou-se clorofórmio, homogeneizou-se no vortex e centrifugou-se a 2000 g, durante 5 minutos, a 4 °C. Recolheu-se a fase superior para frascos identificados e, à fase inferior, adicionou-se clorofórmio e água *Milli-Q*. Homogeneizou-se novamente a mistura no vortex e centrifugou-se sob as mesmas condições já referidas. Repetiu-se a separação da fase superior para os frascos e, à fase inferior, voltou a adicionar-se clorofórmio e água *Milli-Q*. Esta mistura foi homogeneizada e centrifugada pela última vez, sob as condições descritas. Por fim, voltou a recolher-se a fase superior para os frascos e a fase inferior verteu-se para os balões-pêra, de massas conhecidas, por auxílio de funis, com filtro e sulfato de sódio anidro.

Evaporou-se o clorofórmio em evaporador rotativo, com banho a 40 °C e bomba de vácuo a 434 mbar. Após terminar a evaporação do solvente, passou-se o balão-pêra por corrente de azoto para eliminar qualquer vestígio e pesou-se novamente para calcular a massa de gordura obtida.

Parte da gordura foi submetida a catálise ácida, já descrita no capítulo 2.1.2, para libertar os ácidos gordos presentes e injetar no cromatógrafo de fase gasosa, obtendo-se o perfil lipídico de ácidos gordos bioacessível de dourada crua e grelhada e do suplemento alimentar. Outra parte é utilizada para fazer cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography* – *TLC*), com o intuito de separar as várias frações lipídicas, que são também sujeitas a catálise ácida, para posterior injeção no cromatógrafo de fase gasosa.

#### **2.2.4 Determinação das classes de lípidos por cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography* – *TLC*)**

Após extração dos lípidos totais e da fração bioacessível, foi necessário avaliar que classes lipídicas estavam presentes em cada uma das amostras. Para tal, utilizou-se cromatografia em camada fina (*TLC*), descrita por Bandarra *et al.*, 2001 <sup>(2)</sup>.

Este procedimento consiste essencialmente na aplicação das amostras em placas de sílica e comparando os resultados com os padrões.

Existem dois tipos de *TLC*: analítica, que permite identificar e quantificar de forma relativa as diferentes frações lipídicas, e preparativa, que permite conhecer o perfil de ácidos gordos em cada fração de lípidos.

##### **2.2.4.1 *TLC* analítica**

Realizaram-se *TLC* analíticas para conhecer, de forma relativa, a proporção de cada fração de lípidos nas amostras iniciais de dourada, crua e grelhada, e do suplemento, bem como dos respetivos bioacessíveis. O material utilizado e os reagentes constam da tabela 8. Para a realização desta análise, as amostras são concentradas para 12 mg/mL, em clorofórmio.

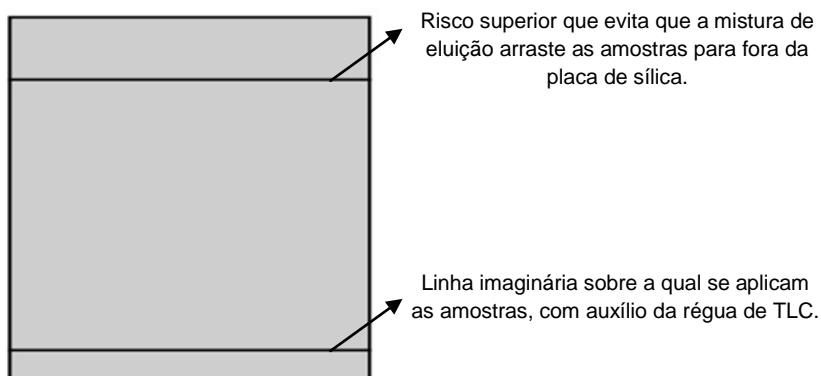
**Tabela 8:** Material e reagentes para TLC analítica

Material e reagentes para TLC analítica		
<b>Material</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Estufa</li> <li>o Exsicador</li> <li>o Câmara de eluição e papel</li> <li>o Placas de sílica-gel 20x20, com 0,25 mm de espessura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Suporte de TLC, lápis metálico e régua</li> <li>o Micropipeta de exclusão total e respetivas pontas</li> <li>o Pulverizador automático</li> </ul>
<b>Reagentes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o n-hexano</li> <li>o Éter dietílico</li> <li>o Ácido fórmico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Padrões de ácidos gordos</li> <li>o Ácido fosfomobilídico hidratado a 10% em etanol</li> </ul>

Para eliminar quaisquer vestígios de humidade e ativar a sílica, a placa foi à estufa, a 110 °C, durante 1 hora, e deixada a arrefecer num exsicador, à temperatura ambiente.

Na câmara de eluição, colocou-se a mistura de eluição, constituída por n-hexano, éter dietílico e ácido fórmico, na proporção 50:50:2, durante 30 minutos, para saturar o ambiente.

Já com a placa de sílica no suporte, fez-se um risco com o lápis metálico a alguns centímetros do topo, para evitar que as amostras atinjam o topo da placa. Com o auxílio da régua de TLC e de uma micropipeta de exclusão total, aplicaram-se 10 µL de cada amostra: gordura inicial de dourada, crua e grelhada, e do suplemento e as respetivas amostras de gordura bioacessíveis, como pode observar-se na figura 10.



**Figura 10:** Representação esquemática da realização de uma TLC analítica

Depois de terminar de aplicar as amostras, a placa foi para a tina de eluição, deixando os solventes eluir até ao risco superior. Após este processo, retirou-se a placa e

deixou-se a mistura evaporar e, de seguida, pulverizou-se a placa com o corante ácido fosfomobilídico hidratado a 10% em etanol. A placa foi então colocada na estufa, durante 1 hora, a 120 °C, para revelação das frações lipídicas. Findo este processo, é possível observar as manchas e, com o auxílio do programa informático *Quantity One*, da PDI, calcularam-se as proporções relativas de cada fração.

#### 2.2.4.2 TLC preparativa

Realizaram-se TLC preparativas para analisar o perfil de ácidos gordos de cada fração de lípidos nas amostras bioacessíveis de dourada, crua e grelhada, e do suplemento. O material utilizado e os reagentes constam da tabela 9. Para a realização desta análise, as amostras são concentradas para 50 mg/mL, em clorofórmio.

**Tabela 9:** Material e reagentes para TLC preparativa

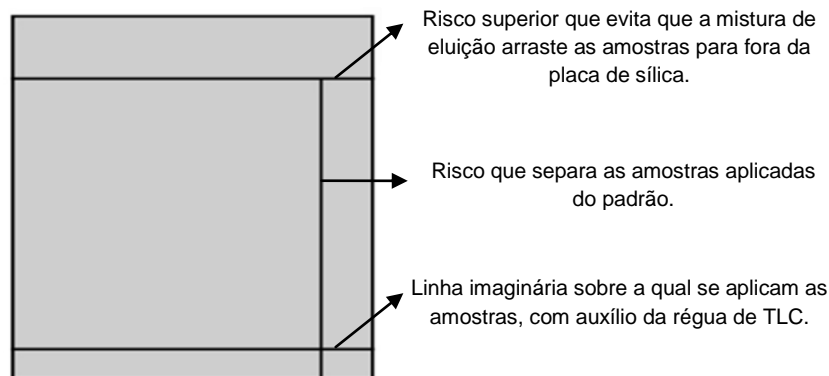
Material e reagentes para TLC preparativa		
<b>Material</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Estufa</li> <li>o Exsicador</li> <li>o Câmara de eluição e papel</li> <li>o Placas de sílica-gel 20x20, com 2 mm de espessura, com indicador de fluorescência</li> <li>o Pulverizador automático</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Suporte de TLC, lápis metálico e régua</li> <li>o Micropipeta de exclusão total e respetivas pontas</li> <li>o Tubos</li> <li>o Espátula metálica</li> <li>o Almofariz e pilão</li> </ul>
<b>Reagentes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o n-hexano</li> <li>o Éter dietílico</li> <li>o Ácido fórmico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o Padrões de ácidos gordos</li> <li>o Solução de diclorofluoresceína de 0,2% em etanol</li> </ul>

De forma semelhante ao já descrito, a placa foi à estufa, a 50 °C, durante 1 hora, e deixada a arrefecer num exsicador, à temperatura ambiente.

Na câmara de eluição, colocou-se a mistura de eluição, constituída por n-hexano, éter dietílico e ácido fórmico, na proporção 50:50:2, 2 folhas de papel absorvente, durante 30 minutos, para saturar o ambiente.

Já com a placa de sílica no suporte, fez-se um risco com o lápis metálico a alguns centímetros do topo, para evitar que as amostras atinjam o topo da placa e outro a alguns

centímetros da extremidade direita, para separar as amostras em estudo do padrão de ácidos gordos. Com o auxílio da régua de TLC e de uma micropipeta de exclusão total, aplicaram-se 25  $\mu$ L de cada amostra: gordura bioacessível de dourada, crua e grelhada, e do suplemento, como pode observar-se na figura 11.



**Figura 11:** Representação esquemática da realização de uma TLC preparativa

Depois de terminar a aplicação das amostras, a placa foi para a tina de eluição, deixando os solventes eluir até ao risco superior. Após este processo, retirou-se a placa e deixou-se a mistura evaporar e, de seguida, pulverizou-se a placa com o corante de diclorofluoresceína de 0,2% em etanol. A placa ficou assim pronta para ser observada na câmara UV e ao fazê-lo foi possível assinalar-se as manchas correspondentes à banda de cada fração, por comparação com o padrão.

Como o auxílio do lápis metálico, isolaram-se as tiras lipídicas e com uma espátula raspou-se cada uma. Recorrendo a um almofariz, esmagou-se a sílica até estar em pó e acondicionou-se em tubos identificados, que ficaram, desta forma, preparados para serem sujeitos a catálise ácida. Após a reação de preparação dos ésteres metílicos, referida no capítulo 2.1.2, foi possível injetar as amostras no cromatógrafo de fase gasosa.

### 2.3 Tratamento estatístico dos dados

Para comparação entre amostras de dourada crua e grelhada utilizou-se o teste *t-student*, utilizando o *software* Microsoft Office Excel 2007. Considerou-se que existem diferenças significativas entre amostras para *p-values* < 0,05.

### 3. Apresentação e discussão dos resultados

Neste capítulo, será feita a identificação e quantificação das diferentes classes de lípidos, tanto na dourada, como no suplemento alimentar, por meio das TLC analíticas e preparativas e da cromatografia de fase gasosa. As TLC analíticas têm como objetivo quantificar de forma relativa as várias classes de lípidos existentes na amostra e a injeção em cromatógrafo de fase gasosa permite quantificar os ácidos gordos presentes.

Para a obtenção do perfil de ácidos gordos em valor absoluto, na fração bioacessível das amostras analisadas, procedeu-se à determinação do perfil de ácidos gordos das soluções de enzimas, utilizadas no decurso do ensaio de bioacessibilidade, e à subtração do valor de cada ácido gordo presente no perfil de ácidos gordos obtidos para a amostra.

Este estudo foca-se nos cinco ácidos gordos maioritariamente presentes nas amostras: o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9), o ácido linoleico (C18:2 $\omega$ 6), o ácido eicosapentaenóico ou EPA (C20:5 $\omega$ 3) e o ácido docosahexaenóico DHA (C22:6 $\omega$ 3) e todos os resultados apresentados são expressos em massa húmida.

#### 3.1 Dourada crua e grelhada

##### 3.1.1 Composição química de dourada crua e grelhada

Como análise preliminar das amostras de dourada crua e dourada grelhada para determinar a composição química de cada uma: humidade, cinza, proteína e gordura – tabela 10.

**Tabela 10:** Composição química, em percentagem, de dourada crua e grelhada

Amostra	Composição química (%)			
	Humidade	Cinza	Proteína	Gordura
Dourada crua	69,84 $\pm$ 0,74	1,28 $\pm$ 0,01	22,51 $\pm$ 0,77	6,18 $\pm$ 1,13
Dourada grelhada	65,04 $\pm$ 1,26	3,38 $\pm$ 0,05	28,25 $\pm$ 3,58	5,07 $\pm$ 0,94

Por análise da tabela 10, verifica-se que, com a grelhagem, o teor de humidade na dourada diminui cerca de 4,8%. Relativamente à percentagem de gordura, o decréscimo é menos significativo: cerca de 1,1%.

### 3.1.2 Perfil de ácidos gordos de dourada crua e grelhada

Após a catálise ácida a que as amostras iniciais de dourada crua e grelhada foram sujeitas, obteve-se o perfil de ácidos gordos que constam da tabela 11, bem como os respetivos desvios à média. Para facilitar a perceção das perdas nos ácidos gordos, apresentam-se os respetivos decréscimos. Os cromatogramas que deram origem aos resultados de seguida apresentados, bem como o seu relatório, podem ser consultados no anexo I e no anexo II.

**Tabela 11:** Perfil de ácidos gordos (mg/100 g) de dourada crua e grelhada

Ácido gordo	Dourada crua inicial (mg/100 g de amostra)	Dourada grelhada inicial (mg/100 g de amostra)	Decréscimo (%)
16:0 (ácido palmítico)	815,56 ± 19,37 <sup>a</sup>	719,02 ± 35,28 <sup>b</sup>	12
18:1ω9 (ácido oleico)	1194,27 ± 33,77 <sup>a</sup>	993,79 ± 39,13 <sup>b</sup>	17
18:2ω6 (ácido linoleico)	383,99 ± 9,51 <sup>a</sup>	319,12 ± 17,83 <sup>b</sup>	17
20:5ω3 (EPA)	311,90 ± 30,32 <sup>a</sup>	243,19 ± 35,25 <sup>b</sup>	22
22:6ω3 (DHA)	968,08 ± 98,59 <sup>a</sup>	819,82 ± 127,72 <sup>b</sup>	15
Saturados	1283,69 ± 63,05 <sup>a</sup>	1109,10 ± 85,71 <sup>b</sup>	14
Monoinsaturados	2042,00 ± 157,45 <sup>a</sup>	1620,55 ± 157,66 <sup>b</sup>	21
Polinsaturados	2258,97 ± 271,99 <sup>a</sup>	1781,30 ± 366,69 <sup>b</sup>	21
Σ Ómega 3	1696,03 ± 197,18 <sup>a</sup>	1339,99 ± 281,81 <sup>b</sup>	21
Σ Ómega 6	497,37 ± 44,80 <sup>a</sup>	396,14 ± 53,05 <sup>b</sup>	20
ω3/ω6	3,41	3,38	-

**Nota:** Realizaram-se testes T para mostrar que as amostras são significativamente diferentes e as letras *a* e *b* representam os resultados derivados desses testes.

Para a dourada, crua ou grelhada, os ácidos gordos polinsaturados são dominantes, seguida dos monoinsaturados. Os ácidos gordos saturados encontram-se em menor quantidade, cujo contributo se deve essencialmente ao ácido palmítico.

Olhando para os ácidos gordos polinsaturados estudados, é fácil perceber que o EPA e o DHA, tão importantes para a saúde e bem-estar, contribuem fortemente para a totalidade de ácidos gordos ómega-3 apurada neste estudo.

Tal como foi referido anteriormente, com o tratamento culinário, a composição química dos alimentos é alterada. Desta forma, espera-se que a fração lipídica seja afetada, tal como

o tratamento estatístico dos dados mostra diferenças significativas. No caso da dourada, verificou-se que, ao ser sujeita a altas temperaturas, os teores de ácidos gordos maioritários diminuíram, assim como os totais de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados.

Na alimentação diária, a quantidade de ácidos gordos ómega-3 ingerida é, normalmente, muito inferior à de ácidos gordos ómega-6. Assim, para que uma dieta seja considerada nutricionalmente equilibrada, a proporção ideal entre estes dois grupos de ácidos gordos polinsaturados deveria ser de 4 partes de ómega-6 para 1 parte de ómega-3, mas em situações de desequilíbrio nutricional podem ocorrer proporções de 20 para 1 <sup>(15)</sup>. Como o pescado é uma fonte por excelência de ácidos gordos ómega-3 e o alimento com a razão  $\omega 3/\omega 6$  mais elevada, utiliza-se o valor desta razão para avaliar qual o contributo do pescado numa dieta saudável. Tendo-se obtido, para as duas amostras, razões  $\omega 3/\omega 6$  que confirmam a importância nutricional deste alimento.

A tabela 12 compara os valores dos grupos de lípidos da dourada crua e grelhada, constantes da *Tabela da Composição de Alimentos*, 2007 <sup>(18)</sup>, do INSARJ (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

**Tabela 12:** Ácidos gordos (mg/100 g) de dourada crua e grelhada

Ácidos gordos	Ácidos gordos em dourada crua (mg/100 g de amostra)		Ácidos gordos em dourada grelhada (mg/100 g de amostra)	
	<i>GoodFish</i>	INSARJ	<i>GoodFish</i>	INSARJ
<b>Saturados</b>	1283,69	2100	1109,10	1900
<b>Monoinsaturados</b>	2042,00	3600	1620,55	3200
<b>Polinsaturados</b>	2258,97	2800	1781,30	3300

Por comparação dos resultados obtidos no GoodFish, tanto para dourada crua, como para dourada grelhada, as diferenças são claras. Os valores fornecidos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge são bastante superiores. As explicações para estas diferenças podem ter a ver com dois fatores: os indivíduos analisados pelo INSARJ serem selvagens ou de aquacultura e a época do ano em que foram capturados. Nas explorações de aquacultura, as rações dadas aos peixes são manipuladas e adaptadas consoante o perfil nutricional pretendido, pelo que a comparação entre indivíduos de explorações diferentes podem não ser muito precisas. Por outro lado, ao longo do ano, o teor de gordura do pescado não é constante, devido às migrações e ao alimento disponível, no caso de ser selvagem.



Os resultados obtidos neste trabalho não estão de acordo com aqueles obtidos por Costa *et al.*, 2013 <sup>(5)</sup>, que observou aumento do teor de ácidos gordos saturados, insaturados e polinsaturados. O artigo referido é o resultado do estudo de corvina crua e grelhada, uma espécie magra, em oposição à dourada, cujo teor de gordura é mais elevado.

Bandarra *et al.*, 2009 <sup>(1)</sup> concluiu que o teor de ácidos gordos ómega-3, no peixe-espada preto, aumenta após a grelhagem, ao invés do que se verificou na dourada. Ainda de acordo com o mesmo artigo, o peixe-espada preto tem cerca de 2,5% de gordura, o que o classifica como semi-gordo. No entanto, por não ser um valor muito elevado, é possível que o mesmo tenha comportamento semelhante ao de um peixe magro.

### 3.1.3 Perfis bioacessíveis totais de dourada crua e grelhada

Após a catálise ácida da gordura extraída das frações bioacessíveis de dourada crua e grelhada, foi possível quantificar os ácidos gordos que constituíam as amostras, como consta da tabela 13, acompanhados dos seus desvios à média. Apresenta-se, também, o decréscimo, em percentagem, de cada ácido gordo. Os cromatogramas que deram origem aos resultados apresentados, bem como os seus relatórios, podem ser consultados no anexo III e no anexo IV.

**Tabela 13:** Perfil de ácidos gordos bioacessíveis (mg/100 g) de dourada crua e grelhada

Ácido gordo	Dourada crua bioacessível (mg/100 g de amostra)	Dourada grelhada bioacessível (mg/100 g de amostra)	Decréscimo (%)
16:0 (ácido palmítico)	503,63 ± 30,07 <sup>a</sup>	399,26 ± 25,66 <sup>b</sup>	21
18:1ω9 (ácido oleico)	779,83 ± 40,41 <sup>a</sup>	504,16 ± 29,50 <sup>b</sup>	35
18:2ω6 (ácido linoleico)	175,45 ± 15,55 <sup>a</sup>	80,90 ± 11,91 <sup>b</sup>	54
20:5ω3 (EPA)	186,92 ± 7,77 <sup>a</sup>	111,24 ± 4,77 <sup>b</sup>	41
22:6ω3 (DHA)	588,07 ± 24,31 <sup>a</sup>	353,03 ± 14,90 <sup>b</sup>	40
Saturados	789,73 ± 47,61 <sup>a</sup>	610,22 ± 39,90 <sup>b</sup>	23
Monoinsaturados	1387,29 ± 56,87 <sup>a</sup>	908,09 ± 41,21 <sup>b</sup>	35
Polinsaturados	1320,35 ± 66,38 <sup>a</sup>	706,80 ± 43,14 <sup>b</sup>	47
Σ Ómega 3	1043,53 ± 43,46 <sup>a</sup>	618,67 ± 26,30 <sup>b</sup>	41
Σ Ómega 6	218,50 ± 20,45 <sup>a</sup>	48,65 ± 15,07 <sup>b</sup>	77
ω3/ω6	4,78	12,72	-

**Nota:** Realizaram-se testes T para mostrar que as amostras são significativamente diferentes e usaram-se as letras *a* e *b* para representar os resultados derivados desses testes.

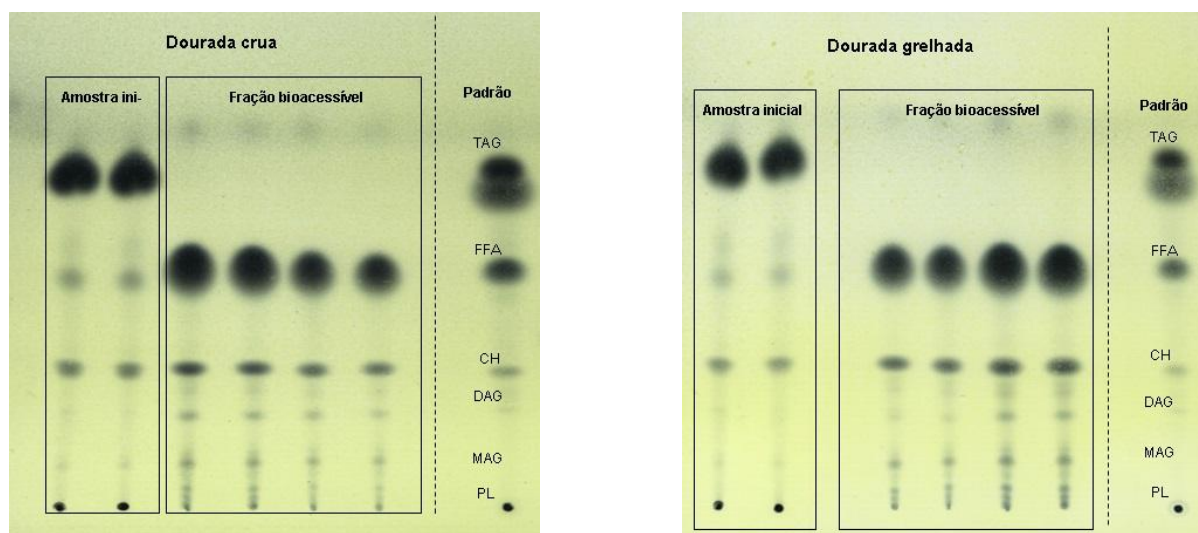
Por observação das tabelas 12 e 13, que contêm as quantidades de ácidos gordos encontradas em cada amostra, crua ou grelhada, inicial ou bioacessível, conclui-se, comparando o perfil inicialmente obtido, para a dourada crua e grelhada, com o perfil da fração bioacessível, que há diminuição de todos os ácidos gordos reportados neste estudo. Este fenómeno deve-se ao facto de, no final do processo digestivo, nem todos os nutrientes ficarem disponíveis para serem assimilados pelo organismo.

Observa-se igualmente que, e ainda que com pequenas diferenças, o grupo de ácidos gordos com mais peso na fração bioacessível é a dos monoinsaturados, seguida pelos polinsaturados, o que indica que poderão ter existido perdas e que nem todos os ácidos gordos polinsaturados ficaram bioacessíveis. Dentro do grupo dos polinsaturados, independentemente da aplicação do tratamento culinário, constata-se que há um maior decréscimo dos valores obtidos para os ácidos gordos comparativamente aos ácidos gordos após a digestão, o que resulta num aumento da razão  $\omega 3/\omega 6$ , nas frações bioacessíveis. Este resultado é uma vez mais portador de boas notícias para o consumidor, que no caso da dourada grelhada é de cerca de 12.

Por meio do tratamento estatístico dos dados, conclui-se que os dados relativos à dourada crua bioacessível são significativamente diferentes dos da dourada grelhada bioacessível, pelo que pode afirmar-se que o tratamento culinário influencia a bioacessibilidade dos ácidos gordos.

#### 3.1.4 Avaliação do modelo digestivo *in vitro*

Para avaliação da eficácia do modelo digestivo *in vitro* aplicado, determinaram-se as diferentes classes de lípidos existentes na dourada crua e grelhada, antes e após serem sujeitas ao ensaio de bioacessibilidade, na figura 12, e procedeu-se à determinação das suas percentagens relativas, que podem ser visualizadas na tabela 14, com o auxílio do programa informático.



**Figura 12:** Classes de lípidos de dourada crua e grelhada, antes e após aplicação do método de digestão *in vitro*

**Tabela 14:** Percentagens relativas de cada classe lipídica nas frações iniciais e bioacessíveis de dourada crua e grelhada

		Percentagem relativa					
		TAG	FFA	CH	DAG	MAG	PL
<b>Dourada crua</b>	Amostra inicial	85,4	4,3	6,5	-	-	3,8
	Amostra bioacessível	-	86,3	10,0	1,3	1,5	0,8
<b>Dourada grelhada</b>	Amostra inicial	87,6	2,2	5,3	-	-	4,8
	Amostra bioacessível	-	84,3	10,9	1,9	2,1	0,8

Pela observação dos resultados obtidos nas TLC analíticas, a classe lipídica dominante nas amostras iniciais, antes da digestão *in vitro*, é a dos TAG e, após sujeitar a amostra ao ensaio de bioaccessibilidade, estes são completamente hidrolisados, dando origem a uma nova classe dominante, os FFA, e a mais outras quatro classes de lípidos com menor expressão: CH, DAG, MAG e PL.

Tendo em consideração que a dourada foi sujeita a um tratamento culinário agressivo, é perfeitamente expectável que haja alterações aquando da comparação entre as amostras iniciais crua e grelhada, pois uma das grandes modificações é a perda de água, fazendo variar percentualmente a quantidade de gordura. Assim, é possível prever o aumento da percentagem de TAG, tal como aconteceu.

Fazendo ainda uma avaliação ao modelo digestivo aplicado, pode afirmar-se que o mesmo é eficaz, uma vez que, à semelhança do que acontece no organismo humano, os TAG foram hidrolisados na totalidade, originando, em grande parte, ácidos gordos livres.

### 3.1.5 Taxa de bioacessibilidade dos ácidos gordos de dourada crua e grelhada

Perante a composição de ácidos gordos já descrita, é importante calcular a taxa de bioacessibilidade de cada um, na tabela 15, pois só assim é possível compreender que fração fica realmente disponível para ser absorvida pelo organismo humano. Esta taxa traduz a percentagem de ácidos gordos da fração inicial do alimento que é realmente disponibilizada para ser assimilada, após a digestão, e calcula-se pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \frac{\text{massa do ácido gordo bioacessível (mg/100 g)}}{\text{massa do ácido gordo na amostra inicial (mg/100 g)}}$$

**Tabela 15:** Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis em dourada crua e grelhada

Ácido gordo	Taxa de bioacessibilidade (%)	
	Dourada crua	Dourada grelhada
16:0 (ácido palmítico)	62	56
18:1ω9 (ácido oleico)	65	51
18:2ω6 (ácido linoleico)	46	25
20:5ω3 (EPA)	60	46
22:6ω3 (DHA)	61	43
Saturados	62	55
Monoinsaturados	68	56
Polinsaturados	58	40
Σ Ómega 3	62	46
Σ Ómega 6	44	27

No que respeita à dourada crua, verifica-se que as percentagens bioacessíveis dos diferentes ácidos gordos se encontram muito próximas, e é possível salientar o ácido palmítico, o EPA e o DHA, com mais de 60% de bioacessibilidade, bem como os ácidos gordos monoinsaturados, também fundamentais para a saúde humana, com uma taxa de bioacessibilidade de 68. Outra constatação que se pode fazer é que 62% dos ácidos gordos ómega-3 presentes na dourada crua ficam bioacessíveis ao organismo humano.

Para a dourada grelhada, os valores de bioaccessibilidade obtidos são inferiores àqueles apurados para a espécie em cru. O EPA e o DHA apresentam uma redução de 14% na percentagem bioaccessível, relativamente à percentagem obtida na dourada crua. Uma vez mais, os ácidos gordos monoinsaturados destacam-se pelo seu grau de bioaccessibilidade de 56%. Ainda assim, menos de metade dos ácidos gordos polinsaturados ficam disponíveis para posterior absorção, sendo a taxa de bioaccessibilidade para os ómega-3 relativamente baixa. No entanto, é importante não esquecer que, tratando-se de uma espécie meio-gorda, ao ingerirmos 100 g de dourada grelhada, estamos a ingerir cerca de 1300 mg destes ácidos gordos, pelo que a assimilação de 46% desta massa é importante.

Tanto para a dourada crua, como para a dourada grelhada, o grupo de ácidos gordos menos bioaccessível é o dos polinsaturados, do qual fazem parte o EPA e o DHA, ambos com taxas de bioaccessibilidade superiores à da sua classe.

Por o salmão ser uma espécie bastante consumida e com elevado teor de gordura, comparar-se-ão os resultados de ácidos gordos de dourada com aqueles que Chaveiro, 2012 <sup>(4)</sup> apresentou na sua dissertação de mestrado.

Para as amostras cruas, no salmão, a taxa de bioaccessibilidade dos ácidos gordos polinsaturados é superior, mas o mesmo não se verifica nos monoinsaturados, para os quais a percentagem de bioaccessibilidade é maior na dourada. O EPA é mais bioaccessível na dourada, mas o DHA tem um valor de bioaccessibilidade superior no salmão, 92%. Relativamente aos ómega-3, as duas taxas são próximas, ambas acima de 60%.

Nas amostras grelhadas, o comportamento dos três grupos de ácidos gordos é semelhante ao das amostras cruas, observando-se que, para os polinsaturados, o maior nível pertence ao salmão, mas que a dos monoinsaturados é superior na dourada. Neste caso, as taxas de bioaccessibilidade do EPA e do DHA no salmão já são mais equilibradas, não deixando, ainda assim, de ser superiores às da dourada. Para o total de ómega-3, nas amostras grelhadas, o salmão tem uma percentagem de bioaccessibilidade de 62%, contra apenas 46% da dourada.

É de salientar que o salmão é um peixe gordo, e portanto com maior quantidade de lípidos de reserva, sob a forma de TAG, comparativamente à dourada espécie semi-gorda, com um teor de lípidos mais baixo, isso torna-se bastante óbvio quando se analisam os seus perfis em cru. No que respeita ao tratamento culinário, uma vez que o salmão tem uma

percentagem de gordura muito superior, as perdas que possam ocorrer, proporcionalmente, vão ser sempre menos significativas do que num peixe menos gordo.

### 3.1.6 Perfis de ácidos gordos, após digestão, de dourada crua e grelhada

Os resultados para o bioacessível da dourada crua constam da tabela 16 e os referentes ao bioacessível da dourada grelhada encontram-se na tabela 17.

**Tabela 16:** Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis para as diferentes classes de lípidos em dourada crua

Ácido gordo	Percentagem de cada classe lipídica em dourada crua bioacessível			
	FFA	DAG+CH *	MAG	PL
16:0 (ácido palmítico)	95,8	1,2	2,0	1,0
18:1 $\omega$ 9 (ácido oleico)	98,1	1,0	0,5	0,4
18:2 $\omega$ 6 (ácido linoleico)	97,4	1,3	0,9	0,4
20:5 $\omega$ 3 (EPA)	96,6	1,4	1,3	0,7
22:6 $\omega$ 3 (DHA)	94,6	1,4	2,3	1,7
Saturados	95,7	1,3	2,0	1,0
Monoinsaturados	97,7	1,1	0,8	0,4
Polinsaturados	95,4	1,6	1,9	1,1
$\Sigma$ Ómega 3	95,0	1,6	2,0	1,4
$\Sigma$ Ómega 6	97,6	1,2	0,8	0,4

\* **Nota:** Os resultados para as frações DAG e CL são apresentados em conjunto pois, após eluição da TLC preparativa foi impossível separar estas duas classes de lípidos, pelo facto não haver uma nítida divisão das bandas.

Na dourada crua, quase a totalidade dos ácidos gordos bioacessíveis está na forma de FFA, ou seja, ocorreu hidrólise dos TAG em DAG e MAG que, posteriormente, dando origem de ácidos gordos livres que se encontram disponíveis para ser absorvidos, sendo possível salientar os ácidos gordos monoinsaturados. Uma vez mais, pode afirmar-se que o processo *in vitro* aplicado é eficaz e está bem adaptado para simular a digestão humana.

Os cromatogramas resultantes das análises às frações bioacessíveis de dourada crua podem ser consultados no anexo V (FFA), no anexo VI (DAG+CH), no anexo VII (MAG) e no anexo VIII (PL), conjuntamente com os respetivos relatórios.

**Tabela 17:** Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis, para as diferentes classes de lípidos de dourada grelhada

Ácido gordo	Percentagem de cada classe lipídica em dourada grelhada bioacessível			
	FFA	DAG+CH *	MAG	PL
16:0 (ácido palmítico)	95,1	1,8	2,4	0,7
18:1 $\omega$ 9 (ácido oleico)	97,7	1,3	0,7	0,3
18:2 $\omega$ 6 (ácido linoleico)	96,1	2,4	1,2	0,3
20:5 $\omega$ 3 (EPA)	94,0	3,1	2,2	0,7
22:6 $\omega$ 3 (DHA)	91,9	2,4	4,1	1,6
Saturados	95,3	1,8	2,2	0,7
Monoinsaturados	97,1	1,5	1,1	0,3
Polinsaturados	92,7	2,9	3,2	1,2
$\Sigma$ Ómega 3	92,0	3,0	3,6	1,4
$\Sigma$ Ómega 6	96,6	2,1	1,0	0,3

\* **Nota:** Tal como aconteceu na dourada crua, os resultados para as frações DAG e CH são apresentados em conjunto pois, após eluição da TLC preparativa foi impossível separar estas duas classes de lípidos, pelo facto não haver uma nítida divisão das bandas.

Na análise da composição em ácidos gordos de frações bioacessíveis de dourada grelhada, à semelhança do que acontece na dourada crua, também quase todos os ácidos gordos bioacessíveis estão na forma livre e os monoinsaturados destacam-se dentro da classe dos FFA.

Os anexos IX (FFA), X (DAG+CH), XI (MAG) e XII (PL), em conjunto com os seus relatórios, dizem respeito às frações bioacessíveis de dourada grelhada.



### 3.2 Suplemento alimentar de ómega-3

#### 3.2.1 Perfis de ácidos gordos do suplemento alimentar de ómega-3

Para o perfil de ácidos gordos do suplemento analisado obteve-se o cromatograma apresentado no anexo XIII e os valores de ácidos gordos apresentados na tabela 18 acompanhados de cada desvio-padrão.

**Tabela 18:** Perfil de ácidos gordos (mg/cápsula) do suplemento alimentar

Ácido gordo	Suplemento alimentar inicial (mg/cápsula)
16:0 (ácido palmítico)	166,76 ± 12,89
18:1 $\omega$ 9 (ácido oleico)	83,48 ± 2,76
18:2 $\omega$ 6 (ácido linoleico)	11,01 ± 0,26
20:5 $\omega$ 3 (EPA)	156,97 ± 14,67
22:6 $\omega$ 3 (DHA)	98,16 ± 16,17
Saturados	301,65 ± 52,20
Monoinsaturados	238,38 ± 15,45
Polinsaturados	408,46 ± 52,35
$\Sigma$ Ómega 3	342,47 ± 42,19
$\Sigma$ Ómega 6	27,42 ± 4,04
$\omega$ 3/ $\omega$ 6	12,49

No suplemento analisado os ácidos gordos polinsaturados são dominantes, seguido dos saturados.

Em representação dos ácidos gordos saturados, o palmítico encontra-se em grande quantidade, assim como o EPA. Como seria de esperar num suplemento alimentar de ómega-3, estes ácidos gordos têm forte presença nas amostras analisadas. Já no que respeita aos ómega-6, a sua expressividade é bastante baixa, o que torna a razão  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 bastante mais elevada que 4, o que, segundo Simopoulos, 1999 <sup>(15)</sup>, contribui para atenuar o desequilíbrio alimentar existente no último século. São, portanto, valores muito benéficos para a saúde.



### 3.2.2 Perfis bioacessíveis totais de suplemento alimentar de ómega-3

Para analisar o perfil bioacessível de ácidos gordos do suplemento alimentar de ómega-3, a cápsula do mesmo foi sujeito ao ensaio de bioacessibilidade. A fração bioacessível resultante encontra-se no anexo XIV e o perfil de ácidos gordos é apresentado na tabela 19, em conjunto com o desvio-padrão correspondente.

**Tabela 19:** Perfil de ácidos gordos bioacessíveis (mg/cápsula) do suplemento alimentar

Ácido gordo	Suplemento alimentar bioacessível (mg/cápsula)
16:0 (ácido palmítico)	89,85 ± 6,30
18:1ω9 (ácido oleico)	47,71 ± 3,11
18:2ω6 (ácido linoleico)	6,58 ± 0,43
20:5ω3 (EPA)	84,61 ± 11,72
22:6ω3 (DHA)	54,22 ± 10,49
Saturados	173,10 ± 20,64
Monoinsaturados	138,75 ± 10,12
Polinsaturados	223,76 ± 31,97
Σ Ómega 3	188,53 ± 28,09
Σ Ómega 6	13,74 ± 2,44
ω3/ω6	13,72

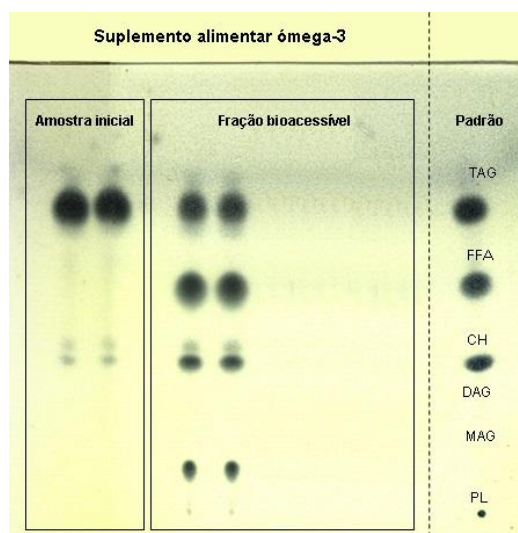
A fração bioacessível do suplemento analisado é também dominada pelos ácidos gordos polinsaturados, seguida da dos saturados. Os monoinsaturados são os menos expressivos, mas, ainda assim, com bastante importância.

O ácido gordo presente em maior quantidade, na fração bioacessível, é o palmítico, seguido do EPA, que foi igualmente encontrado em grande quantidade, contribuindo em conjunto com o DHA, para o somatório tão satisfatório dos ácidos gordos ómega-3.

Tratando-se de um suplemento alimentar de ómega-3, estes ácidos gordos têm representação expressiva e, à semelhança do que se observou na amostra antes da digestão, os ómega-6 estão em baixa quantidade, o que conduz a uma elevada razão ω3/ω6.

### 3.2.3 Avaliação do modelo digestivo *in vitro*

As proporções relativas de cada classe lipídica que constitui o suplemento alimentar de ómega-3 que foi analisado, podem ser visualizadas na figura 13.



**Figura 13:** Classes de lípidos do suplemento alimentar, antes e após aplicação do método de digestão *in vitro*

Com o auxílio do programa informático, foi possível quantificar as percentagens relativas de cada fração, nas amostras: inicial e bioacessível. As mesmas podem ser visualizadas na tabela 20.

**Tabela 20:** Percentagens relativas de cada classe lipídica na fração inicial e bioacessível do suplemento alimentar

		Percentagem relativa					
		TAG	FFA	CH	DAG	MAG	PL
Suplemento alimentar ómega-3	Amostra inicial	97,8	-	2,2	-	-	-
	Amostra bioacessível	35,5	41,8	12,0	10,5	0,4	-

Observando os resultados obtidos nas TLC analíticas, a classe lipídica dominante na amostra inicial do suplemento alimentar, antes da digestão *in vitro*, é a dos TAG, mas ao contrário do que acontece na dourada, estes não se hidrolisam por completo o que resulta

na presença de duas classes maioritárias, FFA e TAG, na fração bioacessível. Outro fator relevante é que nos suplementos não foram detetados fosfolípidos.

Esta foi a primeira vez, de que temos conhecimento, da aplicação de um modelo de digestão laboratorial a um suplemento alimentar e, de acordo com resultados apresentados por Schram *et al.*, 2007 <sup>(13)</sup>, a razão de uma menor taxa de hidrólise e poderá acontecer por o óleo de peixe não fazer parte de uma matriz alimentar, o que aceleraria o processo de digestão. O que Schram *et al.*, 2007 <sup>(13)</sup> concluíram foi que o processo digestivo dos óleos de peixe só era significativo ao fim de pelo menos 4 horas de digestão, mas que apenas ao fim de 6 horas ocorreria a maior bioacessibilidade dos seus ácidos gordos.

No que respeita à eficácia do modelo digestivo aplicado, não é possível, por agora, garantir a sua eficácia. A maioria dos TAG foi hidrolisada, obtendo-se uma fração grande de ácidos gordos livres, no entanto continua a existir 35% de TAG bioacessíveis. É necessário obter informações sobre o processo e a influência da matriz alimentar na assimilação de suplementos alimentares, para poder correlacionar estas informações com os resultados obtidos, no sentido de averiguar a adequação do modelo *in vitro* à simulação da digestão de suplementos alimentares.

#### **3.2.4 Taxa de bioacessibilidade dos ácidos gordos do suplemento alimentar de ómega-3**

Findada a exposição da composição de ácidos gordos constituintes do suplemento alimentar, antes e depois do ensaio de bioacessibilidade, falta calcular a percentagem de bioacessibilidade. A tabela 21 apresenta a percentagem de bioacessibilidade, que foi calculada através da fórmula apresentada no capítulo 3.1.5.

**Tabela 21:** Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis no suplemento alimentar

Ácido gordo	Taxa de bioacessibilidade (%)
16:0 (ácido palmítico)	54
18:1 $\omega$ 9 (ácido oleico)	57
18:2 $\omega$ 6 (ácido linoleico)	56
20:5 $\omega$ 3 (EPA)	54
22:6 $\omega$ 3 (DHA)	55
Saturados	53
Monoinsaturados	56
Polinsaturados	54
$\Sigma$ Ómega 3	55
$\Sigma$ Ómega 6	50

Para terminar a análise ao suplemento alimentar de ómega-3, é necessário focarmo-nos nas taxas de bioacessibilidade de cada ácido gordo estudado. Dentro dos polinsaturados estudados, todos apresentam uma percentagem de bioacessibilidade por volta dos 55%. Individualmente, os cinco ácidos gordos analisados, têm valores de bioacessibilidade muito próximos e, tanto o EPA como o DHA, apresentaram resultados muito satisfatórios.

Os ácidos gordos monoinsaturados são os que obtiveram melhor taxa de bioacessibilidade com 56%. No entanto, não diferem muito da percentagem obtida para os ácidos gordos saturados e os polinsaturados.

No que respeita aos ómega-3, 55% destes, no final da digestão, fica disponível para absorção. Também os ómega-6 obtiveram bons resultados em termos de percentagem bioacessível.

### 3.2.5 Perfis de ácidos gordos, após digestão, do suplemento alimentar

Os resultados para o bioacessível do suplemento alimentar podem ser consultados da tabela 22. Os cromatogramas resultantes das análises às frações bioacessíveis do suplemento alimentar de ómega-3 podem ser consultados no anexo XV (TAG), no anexo XVI (FFA), no anexo XVII (DAG+CH) e no anexo XVIII (MAG), conjuntamente com os respetivos relatórios.

**Tabela 22:** Percentagem de ácidos gordos bioacessíveis, para as diferentes classes de lípidos no suplemento alimentar

Ácido gordo	Percentagem de cada classe lipídica no suplemento alimentar bioacessível			
	TAG	FFA	DAG+CH *	MAG
16:0 (ácido palmítico)	34,2	42,8	23,0	0,0
18:1 $\omega$ 9 (ácido oleico)	24,6	62,4	13,0	0,0
18:2 $\omega$ 6 (ácido linoleico)	6,7	93,3	0,0	0,0
20:5 $\omega$ 3 (EPA)	46,6	31,8	21,4	0,2
22:6 $\omega$ 3 (DHA)	52,3	21,0	26,0	0,7
Saturados	32,8	44,5	22,6	0,1
Monoinsaturados	26,0	58,3	15,6	0,1
Polinsaturados	44,2	32,8	22,7	0,3
$\Sigma$ Ómega 3	46,6	29,9	23,1	0,4
$\Sigma$ Ómega 6	34,0	56,3	9,7	0,0

\* **Nota:** Os resultados para as frações DAG e CL são apresentados em conjunto pois, após eluição da TLC preparativa foi impossível separar estas duas classes de lípidos, pelo facto não haver uma nítida divisão das bandas.

No suplemento alimentar, devido à hidrólise incompleta dos TAG, não existe uma classe de lípidos dominante. É possível observar que os ácidos gordos bioacessíveis se encontram em três configurações principais: TAG, FFA e DAG+CH. Também através da análise das classes de lípidos, se pode afirmar que o modelo digestivo *in vitro* não pareceu totalmente eficaz, pelo que estes ensaios deverão ser repetidos, com o objetivo de melhor perceber o comportamento dos ácidos gordos, ao longo da digestão.

De acordo com Martin *et al.*, 2010 <sup>(10)</sup>, os ácidos gordos ómega-3, na forma de TAG, de óleo de peixe não são completamente hidrolisados durante a digestão. Os resultados obtidos por estes autores indicam que ocorre decréscimo do EPA e do DHA, na forma de TAG, fazendo-os aumentar na forma de FFA, mas não se hidrolisam por completo.

#### 4. Considerações finais

O principal objetivo desta tese passa por compreender um grupo de alimentos tão significativo em Portugal, como o pescado, tentando perceber que quantidade real de ácidos gordos, no final da digestão, fica bioacessível, ou seja, os que podem ser absorvidos pelo organismo. Outro fim deste estudo é entender de que forma a dourada e um suplemento alimentar se comportam aquando do processo digestivo.

A tabela 23 apresenta a taxa de bioaccessibilidade dos ácidos gordos entre dourada crua, antes de ser grelhada e antes da digestão *in vitro*, e a dourada grelhada bioacessível. Esta comparação prende-se com o facto de a dourada não ser habitualmente consumido crua, mas sim grelhada.

**Tabela 23:** Perfil de ácidos gordos bioacessíveis (mg/100 g) de dourada crua inicial e dourada grelhada e respetiva taxa de bioaccessibilidade

Ácido gordo	Dourada crua inicial (mg/100 g de amostra)	Dourada grelhada bioacessível (mg/100 g de amostra)	Taxa de bioaccessibilidade (%)
16:0 (ácido palmítico)	815,56 ± 19,37	399,26 ± 25,66	49
18:1ω9 (ácido oleico)	1194,27 ± 33,77	504,16 ± 29,50	42
18:2ω6 (ácido linoleico)	383,99 ± 9,51	80,90 ± 11,91	21
20:5ω3 (EPA)	311,90 ± 30,32	111,24 ± 4,77	36
22:6ω3 (DHA)	968,08 ± 98,59	353,03 ± 14,90	36
Saturados	1283,69 ± 63,05	610,22 ± 39,90	48
Monoinsaturados	2042,00 ± 157,45	908,09 ± 41,21	44
Polinsaturados	2258,97 ± 271,99	706,80 ± 43,14	31
Σ Ómega 3	1696,03 ± 197,18	618,67 ± 26,30	36
Σ Ómega 6	497,37 ± 44,80	48,65 ± 15,07	10
ω3/ω6	3,41	12,72	-

Praticamente metade dos ácidos gordos presentes na dourada crua ficam bioacessíveis para o organismo. Sabendo que o peixe estudado é semi-gordo e que, portanto, contém quantidades bastante razoáveis de lípidos, assimilar metade da totalidade de ácidos gordos é um bom resultado para o consumidor. Relativamente aos ácidos gordos saturados, associados à ideia de “gordura menos boa” representam a classe lipídica mais baixa, ou seja, encontram-se sempre em menor quantidade que os insaturados, a “boa gordura”. Neste sentido, todas as campanhas de sensibilização para o consumo de

pescado, que têm existido, transmitindo a ideia de que o pescado é saúde, são muito positivas e devem continuar até a ideia chegar a todos os consumidores.

Por não ser suficiente dizer ao consumidor que, como prevenção primária, deve ingerir 500 mg diários de EPA+DHA e, como prevenção secundária, deve duplicar esse valor <sup>(6)</sup>, é importante mostrar-lhe, de forma simplificada, que quantidade de dourada deverá ingerir para assimilar para atingir os valores pretendidos.

Com base na informação nutricional habitualmente fornecida, relativa aos valores de EPA+DHA num peixe antes de ser digerido, o consumidor ingeriria 39 g do mesmo, caso pretendesse absorver a dose preventiva primária destes ácidos gordos. No entanto, com o estudo da bioacessibilidade, é possível informá-lo que, para assimilar os referidos 500 mg de EPA+DHA, precisaria de comer afinal 65 g, uma vez que há perdas durante a digestão – figura 14. O mesmo acontece para a dourada grelhada: após este trabalho já é possível entender que seriam necessários 108 g do peixe, para obter os 500 mg de EPA+DHA, ao invés dos 47 g inicialmente estimados, figura 14.

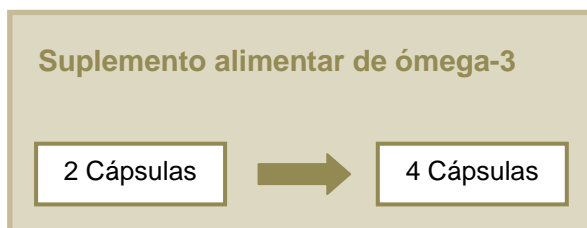


**Figura 14:** Esquema do consumo recomendado de dourada crua e grelhada, para assimilação de 500 mg de EPA+DHA

Para o suplemento alimentar, os valores de EPA e DHA afastaram-se daqueles que a bula refere. As massas por eles referidas são, para cada cápsula, válidas antes da digestão. No entanto, deveria também ser referida a quantidade bioacessível que seria assimilada e, é quando se estuda esse ponto, que se percebe que as quantidades de EPA e de DHA diminuem para menos metade daquelas que o laboratório diz existirem no seu composto de ómega-3.

Usando o mesmo raciocínio que foi feito para a dourada, chega-se à conclusão que deveriam ser consumidas 4 cápsulas, por dia, e não 2, pois não são suficientes para a assimilação da quantidade preventiva primária de EPA+DHA. Fornecendo aos consumidores / nutricionistas / médicos informação sobre a bioacessibilidade dos ácidos gordos de cada cápsula, ajudá-los-ia a adaptar o consumo do suplemento à dose que se

pretende que seja absorvida. A figura 15 ilustra o número de cápsulas consumidas por alguém que pretende assimilar 500 mg de EPA+DHA.



**Figura 15:** Esquema do consumo recomendado do suplemento alimentar de ómega-3, para assimilação de 500 mg de EPA+DHA



## 5. Conclusão

O tratamento culinário aplicado à dourada, promoveu alteração no perfil de ácidos gordos, pois todos os ácidos gordos diminuíram em valor absoluto.

Durante a digestão *in vitro*, tanto a dourada como o suplemento alimentar sofreram perda de ácidos gordos ómega-3, bem como de todos os restantes ácidos gordos: saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Ainda assim a taxa de bioacessibilidade destes, na dourada crua foi de 62% e na dourada grelhada foi de 46%. Para o suplemento alimentar, a taxa de bioacessibilidade dos ácidos gordos ómega-3 foi de 55%.

Para a dourada, o modelo digestivo aplicado verificou-se completamente eficaz, mas o mesmo não aconteceu no suplemento alimentar de ómega-3, pelo que deverá ser aperfeiçoado.

## 6. Perspetivas Futuras

A continuação deste estudo, alargando-o a outras espécies de pescado e a outros tratamentos culinários, é uma mais-valia como complemento da informação até aqui obtida, pois ainda não há um número significativo de estudos na área da bioacessibilidade dos lípidos do peixe, especialmente peixe cozinhado.

Hoje em dia, o consumidor preocupa-se cada vez mais com a sua saúde e vão surgindo mais e mais campanhas publicitárias cuja mensagem é a necessidade de comer peixe, especialmente espécies gordas, pois são as mais ricas em ácidos gordos ómega-3. Por outro lado, o estilo de vida das populações diminui a disponibilidade para cozinhar e preparar refeições demoradas e os suplementos alimentares vão ganhando terreno face aos alimentos “reais”, contribuindo para um maior equilíbrio alimentar.

Os suplementos alimentares são cada vez mais consumidos, para diferentes fins e o consumidor está muito recetivo à sua utilização. Pela primeira vez, no projeto *GoodFish*, foi estudada a bioacessibilidade dos ácidos gordos ómega-3 presentes em suplementos alimentares, de modo a perceber em que medida estes suplementos são um substituto do pescado. Os resultados obtidos não foram exatamente os esperados, pois na fração bioacessível havia uma elevada proporção de TAG, mostrando a baixa eficácia do modelo digestivo e a necessidade de uma otimização do processo digestivo adaptado a esta nova matriz. Assim, este deverá ser um tema a desenvolver num futuro próximo.

Por fim, e tendo em conta que o projeto *GoodFish* contribuiu para melhorar a informação nutricional sobre os produtos da pesca e aquacultura seria interessante num futuro próximo a divulgação dos resultados obtidos de forma mais abrangente e com uma linguagem menos científica, de modo a informar o consumidor sobre a bioacessibilidade dos ácidos gordos ómega-3, tão importantes na prevenção de variadas doenças, como a cardiovascular.

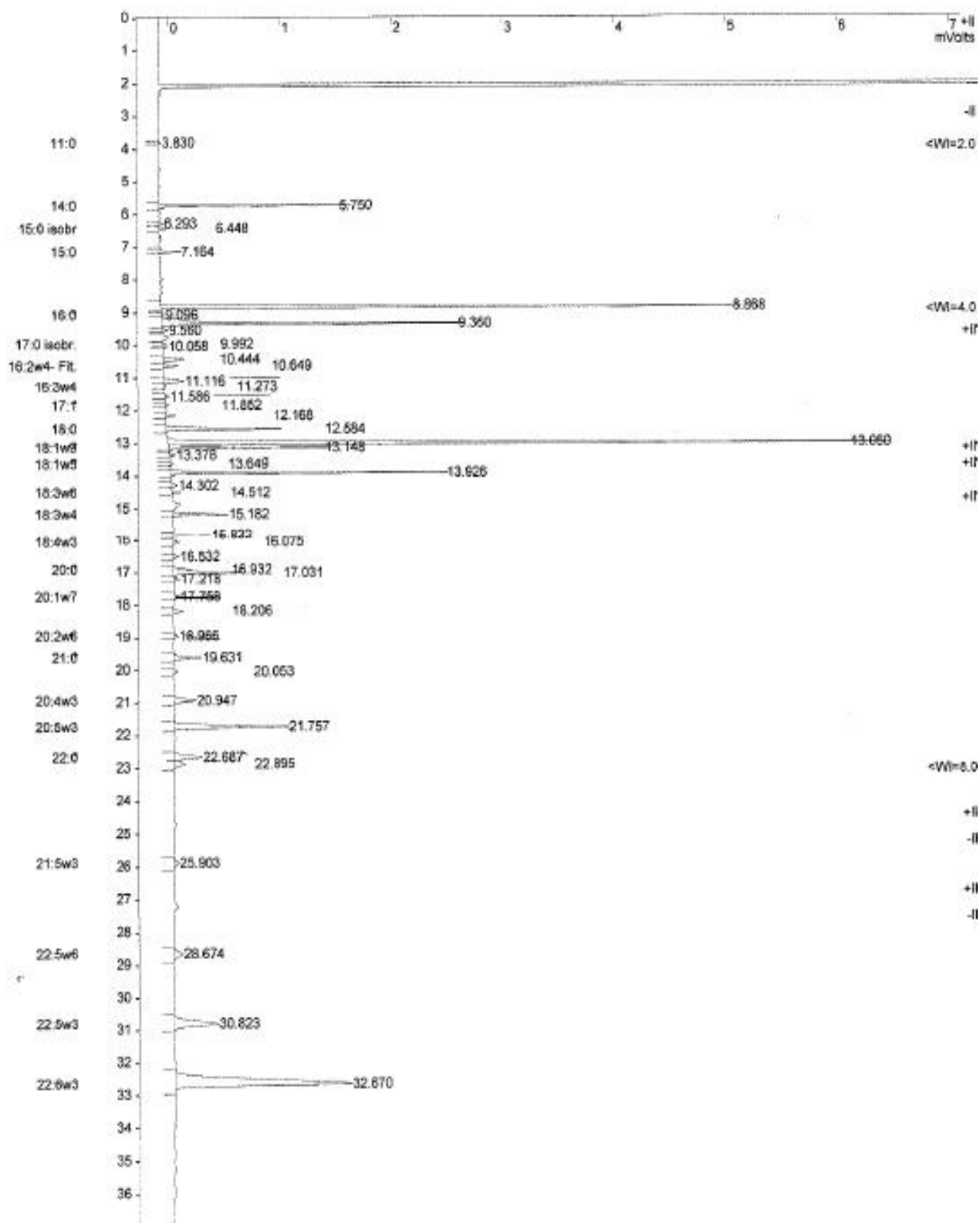
## 7. Fontes bibliográficas

1. BANDARRA, N. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L., 2009. **Chemical Composition and Nutritional Value of Raw and Cooked Black Scabbardfish (*Aphanopus carbo*).** *Scientia Marina*, vol. 73, pp. 105-113.
2. BANDARRA, N. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; EMPIS, J. M., 2001. **Seasonal Variation in the Chemical Composition of Horse-mackerel (*Trachurus trachurus*).** *European Food Research and Technology*, vol. 212, pp 535-539.
3. BLIGH, E. G.; DYER, W. J., 1959. **A Rapid Method for Total Lipid Extraction and Purification.** *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37, pp. 911-917.
4. CHAVEIRO, N., 2012. **Bioacessibilidade de Ácidos Gordos Ómega-3 em Salmão e Corvina de Aquacultura.** *Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa*.
5. COSTA, S.; AFONSO, C.; BANDARRA, N. M.; GUEIFÃO, S.; CASTANHEIRA, I.; CARVALHO, M. L.; CARDOSO, C.; NUNES, M. L., 2013. **The Emerging Farmed Fish Species Meagre (*Argyrosomus regius*): How Culinary Treatment Affects Nutrients and Contaminants Concentration and Associated Benefit-risk Balance.** *Food and Chemical Toxicology*, vol. 60, pp. 277-285.
6. CUNNANE, S.; DREVON, C.; HARRIS, W.; SINCLAIR, A.; SPECTOR, A., 2004. **Recommendations for Dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Healthy Adults.** *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*.
7. DAVIS, C.; MCMURRY, K., 2009. **2010 Dietary Guidelines.** *American Heart Association*. Washington, DC.
8. FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2013. ***Sparus aurata* (Linnaeus, 1758).** *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
9. FERREIRA, F. A. G., 1983. **Nutrição Humana.** *Fundação Calouste Gulbenkian*. Lisboa.

10. MARTIN, D.; NIETO-FUENTES, J. A.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G.; SOLER-RIVAS, C., 2010. **Intestinal Digestion of Fish Oils and  $\omega$ -3 Concentrates Under in Vitro Conditions.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 112, pp. 1315-1322.
11. MORADI, Y.; BAKAR, A.; MOTALEBI, A. A.; MUHAMAD, S. D.; MAN, Y. C., 2011. **A Review on Fish Lipid: Composition and Changes During Cooking Methods.** *Journal of Aquatic Food Product Technology*, vol. 20, pp. 379-390. Londres. ISSN: 1049-8850.
12. NUNES, M. L.; BATISTA, I.; BANDARRA, N. M.; MORAIS, M. G.; RODRIGUES, P. O., 2008. **Produtos da Pesca: Valor Nutricional e Importância para a Saúde e Bem-estar dos Consumidores.** *Publicações Avulsas do IPIMAR*, vol. 18. Lisboa. ISSN: 0872-914X.
13. SCHARAM, L. B.; NIELSEN, C. J.; PORSGAARD, T.; NIELSEN, N. S.; HOLM, R.; MU, H., 2007. **Food Matrices Affect the Bioavailability of (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids in a Single Meal Study in Humans.** *Food Research International*, vol. 40, pp. 1062-1068.
14. SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A., 2002. **Chemical and Functional Properties of Food Lipids.** CRC Press. ISBN: 978-1-58716-105-6.
15. SIMOPOULOS, A. P., 1999. **Essential Fatty Acids in Health and Chronic Disease.** *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 70, pp. 560-569.
16. SMEDES, F., 1999. **Determination of Total Lipid Using Non-chlorinated Solvents.** *Analyst*, vol. 124, pp. 1711-1718.
17. Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department, 2012. **FAO 2010 yearbook.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma.
18. **Tabela de Composição dos Alimentos**, 2007. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa. ISBN: 978-972-8643-19-5.
19. VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M., 2005. **Applicability of an in Vitro Digestion Model in Assessing the Bioaccessibility of Mycotoxins from Food.** *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, pp. 31-40. ISSN: 0278-6915.

## **Anexos**

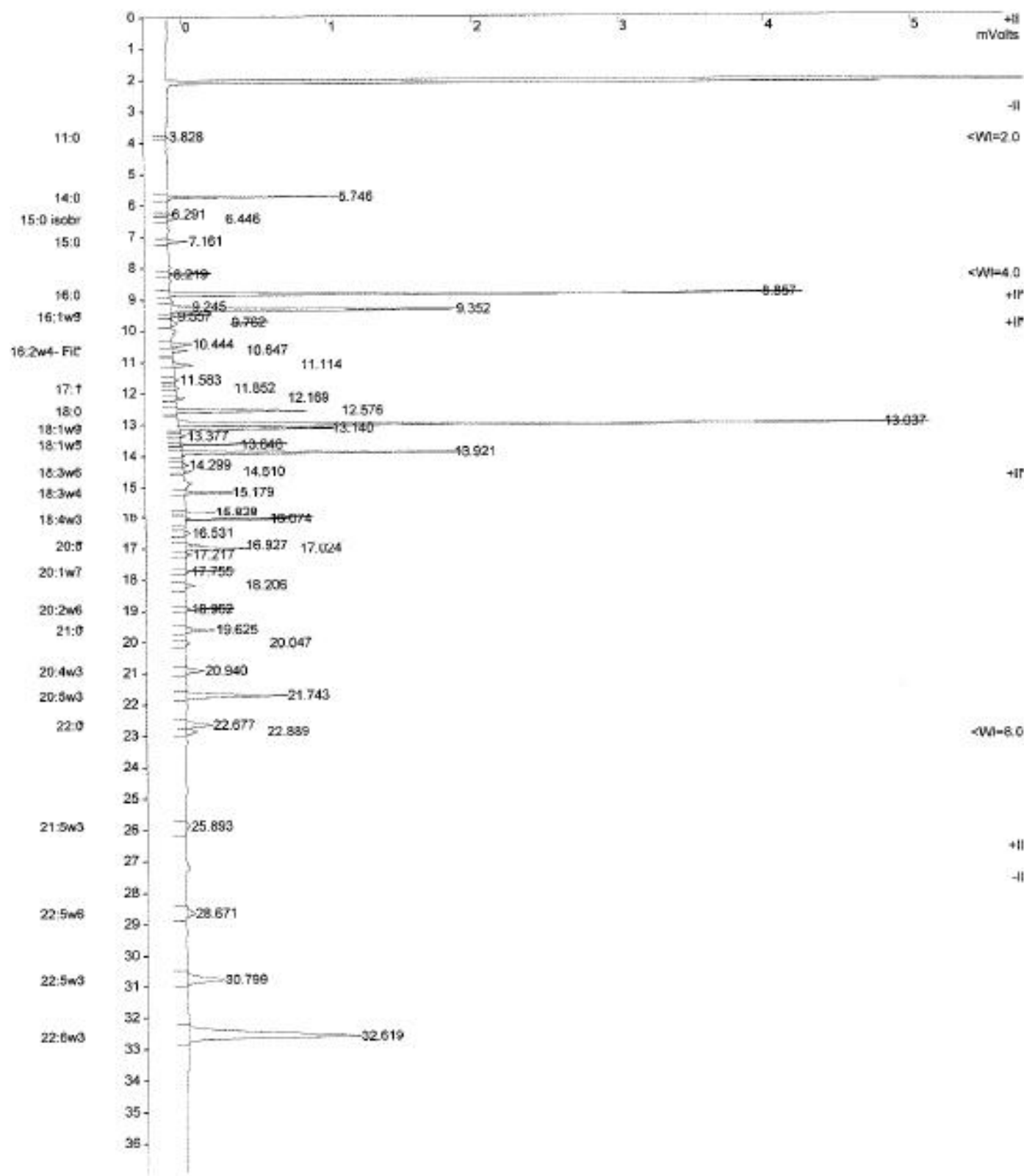
## Anexo I: Cromatograma e relatório de dourada crua inicial total



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.03	3.830	-0.039	46	BB	1.8	
2	12:0		4.841					M
3	13:0		5.106					M
4	14:0 isobr		5.427					M
5	14:0	3.66	5.750	-0.050	4862	BB	2.6	
6		0.09	6.293	0.000	116	BB	2.7	
7	15:0 isobr	0.14	6.448	-0.052	182	BB	2.9	
8	15:0 ante-is		6.800					M
9	15:0	0.48	7.164	-0.136	639	BB	2.9	
10	16:0 ante-is		8.500					M
11		14.60	8.868	0.000	19415	BB	3.5	
12	16:0	0.07	9.096	0.096	90	BV	3.1	
13		7.53	9.360	0.000	10014	VB	3.1	
14	16:1w9	0.13	9.560	0.058	169	TS	0.0	
15	16:1w7		9.742					M
16	17:0 isobr.	0.06	9.992	0.092	83	BV	3.3	
17		0.10	10.058	0.000	130	VB	4.5	
18		0.69	10.444	0.000	917	BV	4.3	
19	16:2w4- Fit.	0.40	10.649	0.050	527	VB	3.6	
20	17:0		10.800					M
21		0.76	11.116	0.000	1009	BV	5.3	
22	16:3w4	0.07	11.273	0.032	89	VB	6.1	
23		0.11	11.586	0.000	150	BB	3.9	
24	17:1	0.09	11.852	0.073	117	BB	3.4	
25	16:3w3		12.000					M
26	16:4w3	0.26	12.168	-0.151	341	BB	3.3	
27	18:0	3.28	12.584	-0.166	4368	BB	4.0	
28		21.70	13.050	0.000	28862	BV	4.1	
29	18:1w9	3.32	13.148	-0.034	4412	VB	2.9	
30	18:1w7	0.13	13.378	0.066	171	BB	3.0	
31	18:1w5	0.08	13.649	0.069	110	BB	3.3	
32	19:0 isobr	6.74	13.926	0.116	8957	BB	3.3	
33	18:2w6		14.085					M
34		0.18	14.302	0.000	245	BP	3.3	
35	18:3w6	0.24	14.512	0.029	316	FB	3.7	
36	19:0		14.695					M
37	18:3w4	1.33	15.182	0.094	1764	BB	3.3	
38	18:3w3		15.360					M
39		0.95	15.832	0.000	1265	BB	3.5	
40	18:4w3	0.18	16.075	0.065	239	BB	3.8	
41		0.19	16.532	0.000	247	BB	4.4	
42	20:0	0.44	16.932	0.132	591	BV	5.2	
43	20:1w11	2.33	17.031	-0.069	3102	VB	4.5	
44	20:1w9	0.18	17.218	-0.042	242	TS	0.0	
45	20:1w7	0.22	17.758	0.291	291	BB	4.7	
46		0.35	18.206	0.000	467	BB	4.7	
47	20:2w6	0.16	18.966	0.366	211	BB	4.8	
48	21:0	1.01	19.631	-0.069	1346	BB	5.0	
49	20:4w6	0.18	20.053	0.153	235	BB	5.6	
50	20:3w3		20.230					M
51	20:4w3	0.90	20.947	-0.313	1196	BB	5.8	
52	20:5w3	5.00	21.757	-0.334	6653	BB	6.1	
53	22:0	1.52	22.687	0.487	2021	BV	7.4	
54	22:1w11	0.58	22.895	-0.405	772	VB	7.4	
55	22:1w9		23.900					M
56	21:5w3	0.31	25.903	-0.458	416	BB	8.1	
57	23:0		26.500					M
58	22:4w6		27.900					M
59	22:5w6	0.59	28.674	-0.427	783	BB	9.3	
60	22:5w3	3.32	30.823	-0.587	4411	BB	10.4	
61	24:0		32.000					M
62	22:6w3	15.34	32.670	-0.530	20401	BB	12.1	
63	24 :1w9		35.205					M
Totals:		100.02		-1.593	132990			



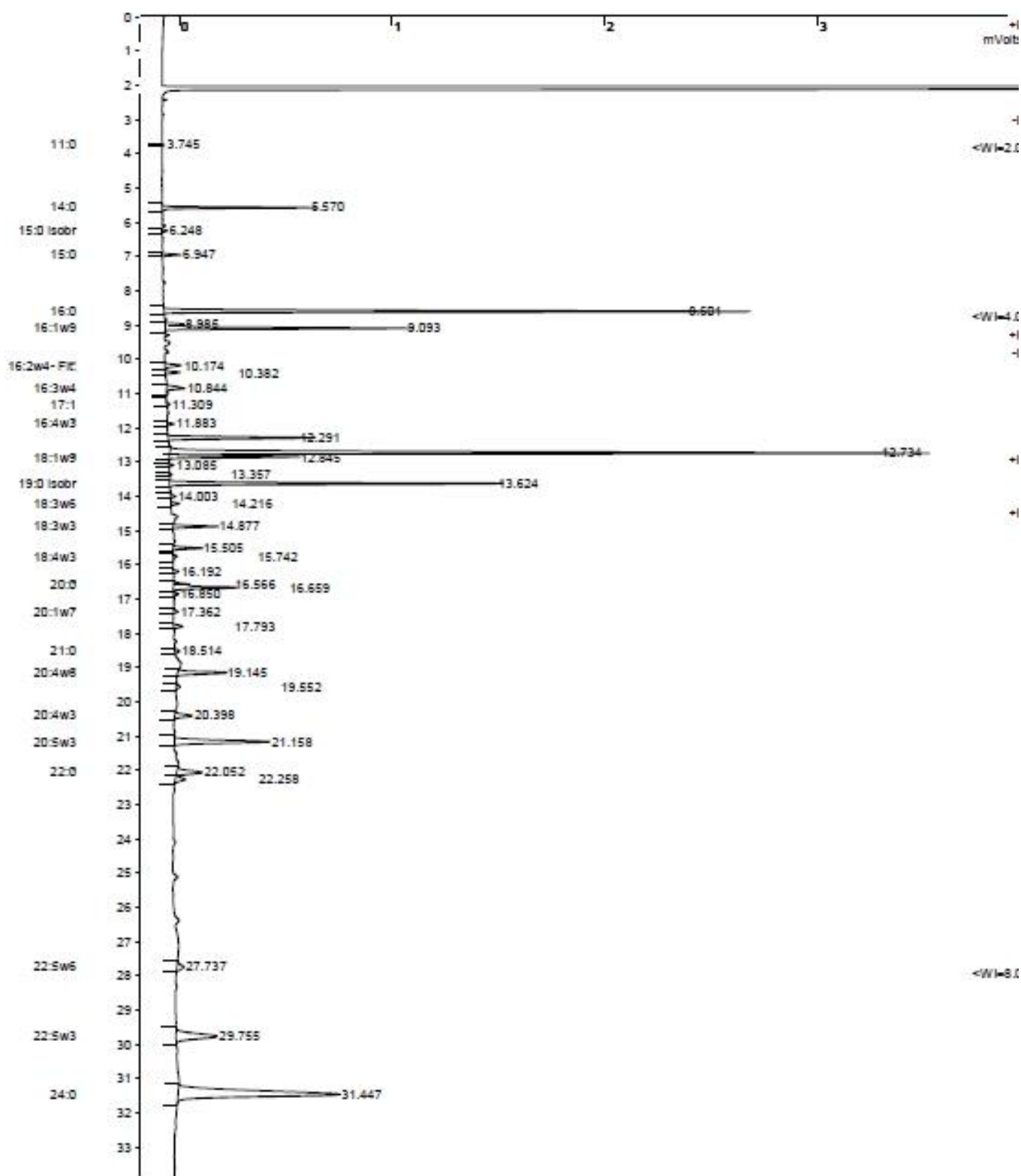
## Anexo II: Cromatograma e relatório de dourada grelhada inicial





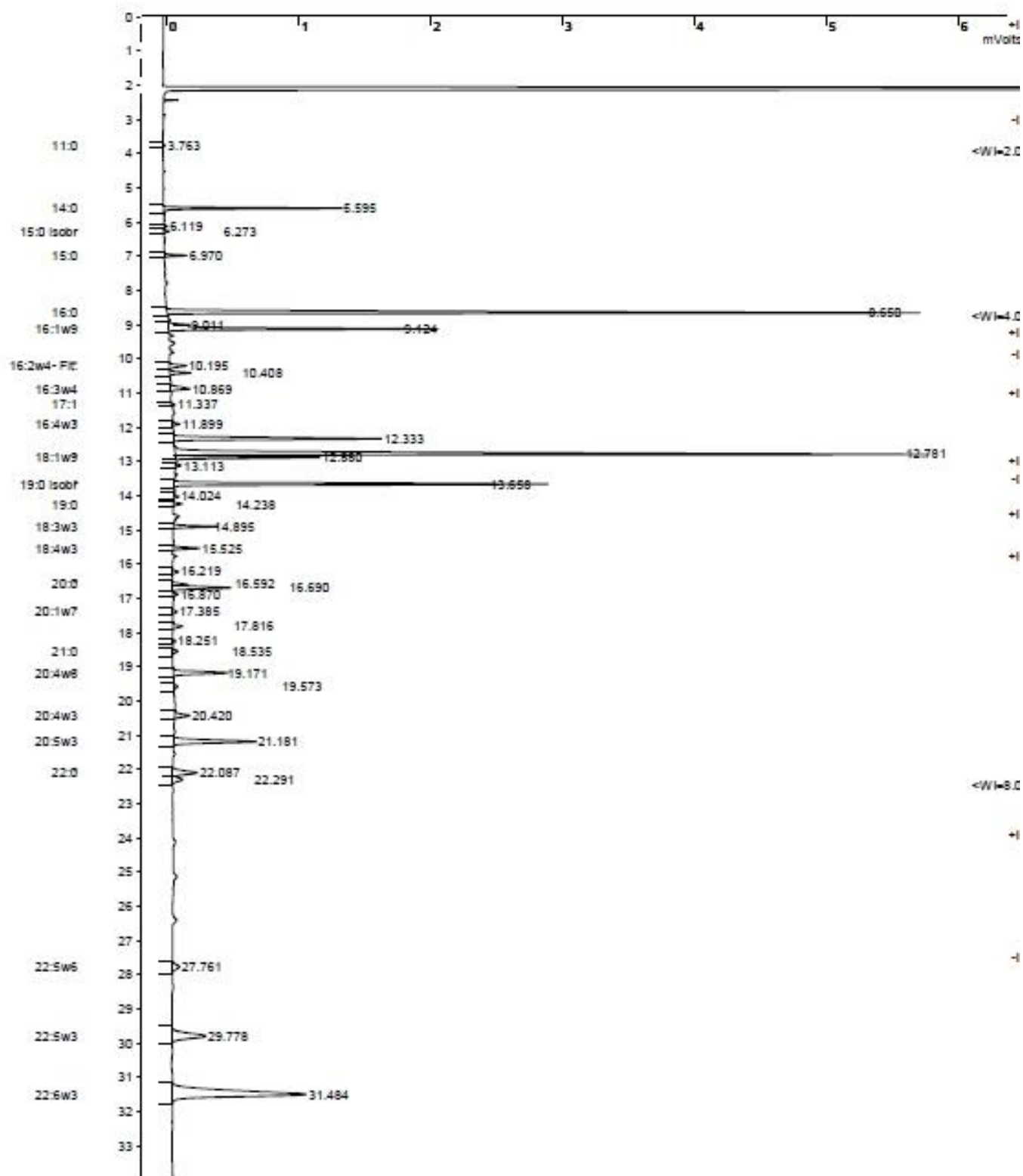
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.03	3.828	-0.042	32	BB	1.9	
2	12:0		4.841					M
3	13:0		5.106					M
4	14:0 isobr		5.427					M
5	14:0	3.40	5.746	-0.054	3330	BB	2.6	
6		0.08	6.291	0.000	81	BB	2.6	
7	15:0 isobr	0.13	6.446	-0.054	123	BB	2.8	
8	15:0 ante-is		6.800					M
9	15:0	0.46	7.161	-0.139	455	BB	3.0	
10		0.11	8.219	0.000	106	BB	3.7	
11	16:0 ante-is		8.500					M
12	16:0	15.55	8.857	-0.143	15237	BB	3.3	
13		0.48	9.245	0.000	468	BV	4.8	
14		6.79	9.352	0.000	6657	VB	3.0	
15	16:1w9	0.13	9.557	0.056	124	TS	0.0	
16	16:1w7	0.32	9.762	0.020	312	TS	0.0	
17	17:0 isobr.		9.900					M
18		0.64	10.444	0.000	632	BV	4.4	
19	16:2w4- Fit.	0.41	10.647	0.048	398	VB	3.5	
20	17:0		10.800					M
21	16:3w4	0.68	11.114	-0.127	670	BB	5.1	
22		0.12	11.593	0.000	118	BB	4.0	
23	17:1	0.11	11.852	0.072	108	BB	3.7	
24	16:3w3		12.000					M
25	16:4w3	0.25	12.169	-0.151	241	BB	3.7	
26	18:0	3.75	12.576	-0.174	3676	BB	3.9	
27		22.48	13.037	0.000	22021	BV	4.0	
28	18:1w9	3.40	13.140	-0.042	3327	VB	3.0	
29	18:1w7	0.14	13.377	0.065	135	BB	3.2	
30	18:1w5	0.08	13.648	0.068	81	BB	3.1	
31	19:0 isobr	7.27	13.921	0.111	7118	BB	3.5	
32	18:2w6		14.085					M
33		0.17	14.299	0.000	164	BP	3.4	
34	18:3w6	0.23	14.510	0.028	221	PB	3.8	
35	19:0		14.695					M
36	18:3w4	1.18	15.179	0.091	1161	BB	3.3	
37	18:3w3		15.360					M
38		0.80	15.828	0.000	780	BB	3.5	
39	18:4w3	0.17	16.074	0.064	168	BB	4.0	
40		0.22	16.531	0.000	213	BB	4.6	
41	20:0	0.43	16.927	0.128	423	BV	4.9	
42	20:1w11	2.31	17.024	-0.076	2265	VB	4.6	
43	20:1w9	0.18	17.217	-0.043	181	TS	0.0	
44	20:1w7	0.17	17.755	0.288	164	BB	4.3	
45		0.36	18.206	0.000	355	BB	4.7	
46	20:2w6	0.16	18.962	0.362	158	BB	4.6	
47	21:0	1.08	19.625	-0.076	1056	BB	5.0	
48	20:4w6	0.16	20.047	0.147	160	BB	5.3	
49	20:3w3		20.230					M
50	20:4w3	0.78	20.940	-0.320	766	BB	5.6	
51	20:5w3	4.43	21.743	-0.348	4338	BB	5.8	
52	22:0	1.50	22.677	0.477	1472	BV	7.7	
53	22:1w11	0.58	22.889	-0.411	572	VB	7.7	
54	22:1w9		23.900					M
55	21:5w3	0.26	25.893	-0.467	256	BB	7.9	
56	23:0		26.500					M
57	22:4w6		27.900					M
58	22:5w6	0.60	28.671	-0.429	588	BB	9.6	
59	22:5w3	2.91	30.799	-0.611	2852	BB	10.6	
60	24:0		32.000					M
61	22:6w3	14.50	32.619	-0.581	14210	BB	11.5	
62	24 :1w9		35.205					M
Totals:		99.99		-2.263	97973			

## Anexo III: Cromatograma e relatório de dourada crua bioacessível



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.03	3.745	-0.021	21	BB	1.7	
2	12:0		4.064					M
3	13:0		4.536					M
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	3.15	5.570	-0.076	1929	BB	2.4	
6	15:0 isobr	0.11	6.248	-0.091	68	BB	2.5	
7	15:0 ante-is		6.647					M
8	15:0	0.43	6.947	-0.101	262	BB	2.6	
9	16:0 ante-is		8.227					M
10	16:0	15.07	8.601	-0.122	9235	BB	3.1	
11		0.61	8.985	0.000	374	BV	4.3	
12	16:1w9	6.21	9.093	-0.142	3807	VB	3.0	
13	16:1w7		9.275					M
14	17:0 isobr.		9.593					M
15	16:2w4- Fit.	0.59	10.174	-0.101	364	BV	4.4	
16	17:0	0.42	10.382	-0.099	255	VB	3.4	
17	16:3w4	0.82	10.844	-0.069	505	BB	5.3	
18	17:1	0.10	11.309	-0.101	61	BB	4.2	
19	16:3w3		11.675					M
20	16:4w3	0.20	11.883	-0.110	123	BB	3.3	
21	18:0	4.22	12.291	-0.110	2589	BB	3.5	
22		22.29	12.734	0.000	13660	BV	3.5	
23	18:1w9	3.15	12.845	-0.023	1930	VB	3.0	
24	18:1w7		12.976					M
25	18:1w5	0.13	13.085	-0.109	82	BB	3.0	
26		0.08	13.357	0.000	49	BB	3.5	
27	19:0 isobr	9.06	13.624	-0.020	5555	BB	3.3	
28	18:2w6		13.724					M
29		0.18	14.003	0.000	113	BV	3.7	
30	18:3w6	0.27	14.216	0.100	168	VB	3.7	
31	19:0		14.330					M
32	18:3w4		14.726					M
33	18:3w3	1.20	14.877	-0.116	737	BB	3.2	
34		0.85	15.505	0.000	519	BB	3.4	
35	18:4w3	0.17	15.742	0.101	102	BB	3.7	
36		0.19	16.192	0.000	116	BB	4.4	
37	20:0	0.47	16.566	0.065	288	BV	4.3	
38	20:1w11	2.14	16.659	-0.046	1314	VP	4.0	
39	20:1w9	0.17	16.850	0.045	104	PB	0.0	
40	20:1w7	0.18	17.362	0.375	109	BB	4.3	
41	20:2w6	0.34	17.793	-0.158	211	BB	4.6	
42	21:0	0.19	18.514	-0.169	117	BB	4.7	
43	20:4w6	1.90	19.145	-0.187	1167	BB	4.7	
44	20:3w3	0.18	19.552	-0.195	109	BB	5.2	
45	20:4w3	0.79	20.398	-0.229	483	BB	5.3	
46	20:5w3	4.41	21.158	-0.347	2700	BB	5.5	
47	22:0	1.38	22.052	0.057	846	BV	6.4	
48	22:1w11	0.52	22.258	-0.235	320	VB	5.3	
49	22:1w9		22.803					M
50	21:5w3		25.415					M
51	23:0		25.969					M
52	22:4w6		26.667					M
53	22:5w6	0.48	27.737	-0.365	294	BB	7.7	
54	22:5w3	3.27	29.755	-0.446	2005	BB	9.9	
55	24:0	14.02	31.447	0.554	8591	BB	10.7	
56	22:6w3		32.026					M
57	24:1w9		33.505					M
Totals:		99.97		-2.491	61282			

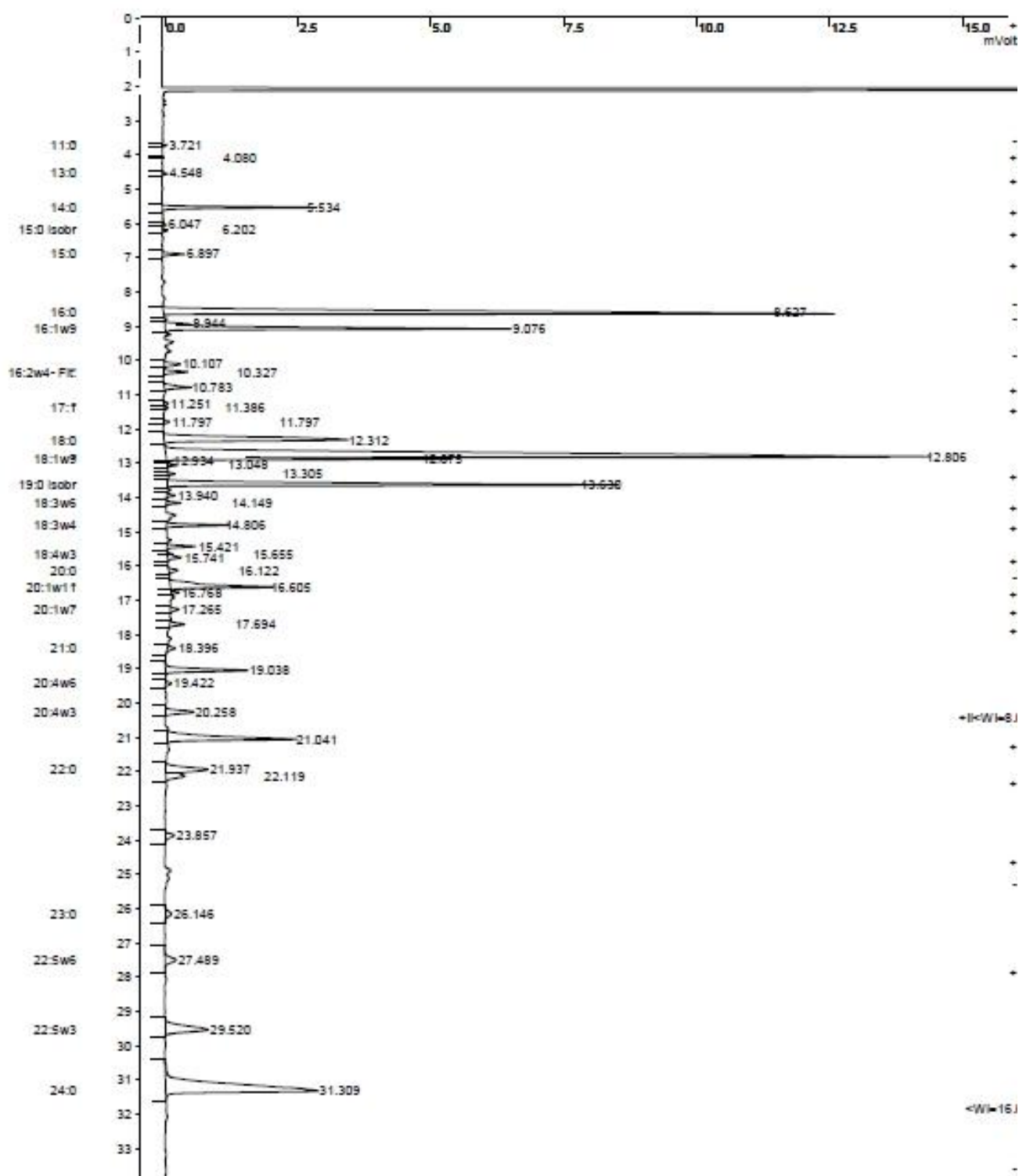
## Anexo IV: Cromatograma e relatório de dourada grelhada bioacessível





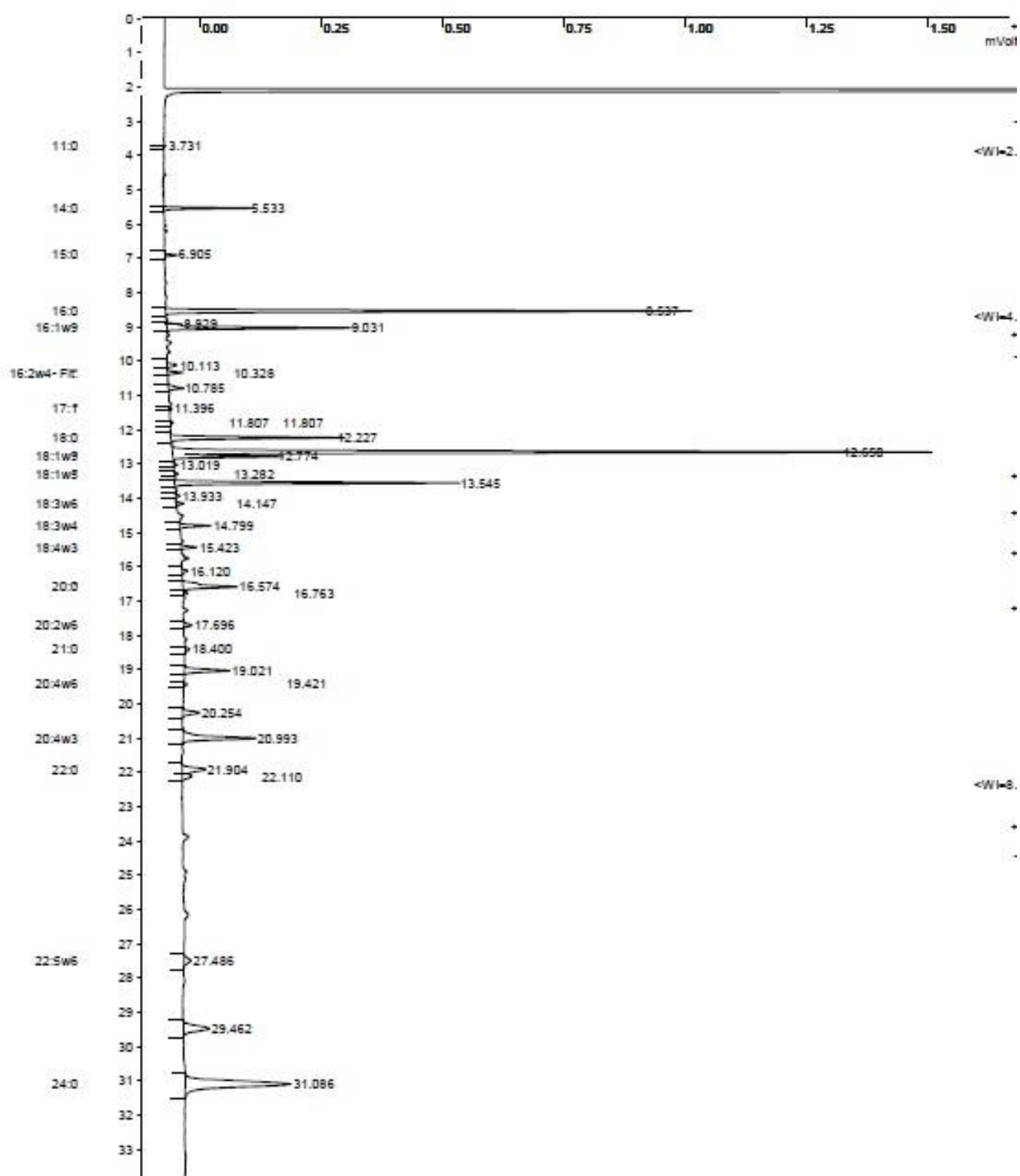
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.04	3.763	-0.003	38	BB	1.8	
2	12:0		4.064					M
3	13:0		4.536					M
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	3.46	5.595	-0.051	3711	BB	2.5	
6		0.07	6.119	0.000	80	BB	2.5	
7	15:0 isobr	0.12	6.273	-0.067	131	BB	2.8	
8	15:0 ante-is		6.647					M
9	15:0	0.49	6.970	-0.078	526	BB	2.8	
10	16:0 ante-is		8.227					M
11	16:0	19.30	8.650	-0.073	20683	BB	3.4	
12		0.60	9.011	0.000	645	BV	4.1	
13	16:1w9	6.30	9.124	-0.111	6755	VB	3.0	
14	16:1w7		9.275					M
15	17:0 isobr.		9.593					M
16	16:2w4- Fit.	0.59	10.195	-0.080	628	BV	4.6	
17	17:0	0.57	10.408	-0.073	613	VB	3.5	
18	16:3w4	0.72	10.869	-0.044	777	BB	5.3	
19	17:1	0.09	11.337	-0.073	92	BB	0.0	
20	16:3w3		11.675					M
21	16:4w3	0.17	11.899	-0.094	187	BB	3.1	
22	18:0	5.94	12.333	-0.068	6363	BP	3.8	
23		21.92	12.781	0.000	23493	PV	3.8	
24	18:1w9	3.11	12.880	0.012	3329	VB	2.9	
25	18:1w7		12.976					M
26	18:1w5	0.14	13.113	-0.082	153	BB	3.0	
27	19:0 isobr	9.23	13.658	0.014	9895	BB	3.3	
28	18:2w6		13.724					M
29	18:3w6	0.15	14.024	-0.092	164	BB	3.4	
30	19:0	0.23	14.238	-0.092	245	BB	3.3	
31	18:3w4		14.726					M
32	18:3w3	1.09	14.895	-0.098	1170	BB	3.2	
33	18:4w3	0.70	15.525	-0.116	756	BB	3.4	
34		0.20	16.219	0.000	219	BB	4.2	
35	20:0	0.41	16.592	0.091	441	BV	4.5	
36	20:1w11	1.86	16.690	-0.015	1997	VP	4.2	
37	20:1w9	0.15	16.870	0.065	163	PB	0.0	
38	20:1w7	0.14	17.385	0.398	151	BB	4.2	
39	20:2w6	0.30	17.816	-0.135	323	BB	4.3	
40		0.10	18.251	0.000	105	BB	4.5	
41	21:0	0.19	18.535	-0.148	206	BB	4.8	
42	20:4w6	2.00	19.171	-0.161	2146	BB	4.8	
43	20:3w3	0.15	19.573	-0.174	160	BB	5.2	
44	20:4w3	0.62	20.420	-0.208	668	BB	5.3	
45	20:5w3	3.41	21.181	-0.323	3650	BB	5.4	
46	22:0	1.27	22.087	0.092	1358	BV	6.9	
47	22:1w11	0.49	22.291	-0.202	530	VB	6.7	
48	22:1w9		22.803					M
49	21:5w3		25.415					M
50	23:0		25.969					M
51	22:4w6		26.667					M
52	22:5w6	0.42	27.761	-0.341	447	BB	8.3	
53	22:5w3	2.50	29.778	-0.423	2678	BB	9.9	
54	24:0		30.893					M
55	22:6w3	10.73	31.484	-0.542	11495	BB	10.6	
56	24 :1w9		32.505					M
Totals:		99.97		-3.295	107171			

## Anexo V: Cromatograma e relatório da fração FFA de dourada crua bioacessível



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.04	3.721	-0.045	193	BB	2.1	
2	12:0	0.00	4.080	0.016	1	BB	0.0	
3	13:0	0.06	4.548	0.012	253	BB	2.4	
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	2.20	5.534	-0.112	9549	BB	3.1	
6		0.05	6.047	0.000	214	BP	2.8	
7	15:0 isobr	0.09	6.202	-0.137	378	PB	3.0	
8	15:0 ante-is		6.647					M
9	15:0	0.37	6.897	-0.151	1596	BB	3.4	
10	16:0 ante-is		8.227					M
11	16:0	15.76	8.627	-0.095	68446	BB	5.3	
12		0.38	8.944	0.000	1654	BV	5.0	
13	16:1w9	5.91	9.076	-0.159	25683	VB	3.5	
14	16:1w7		9.275					M
15	17:0 isobr.		9.593					M
16		0.37	10.107	0.000	1627	BV	4.8	
17	16:2w4- Fit.	0.50	10.327	0.052	2191	VB	4.3	
18	17:0		10.481					M
19	16:3w4	0.61	10.783	-0.130	2661	BB	4.6	
20		0.10	11.251	0.000	431	BV	5.6	
21	17:1	0.06	11.386	-0.024	279	VB	4.1	
22	16:3w3	0.10	11.797	0.122	428	BB	3.6	
23	16:4w3		11.993					M
24	18:0	6.01	12.312	-0.089	26100	BP	7.5	
25		25.99	12.806	0.000	112892	PV	7.8	
26	18:1w9	3.28	12.875	0.007	14255	VB	2.8	
27	18:1w7	0.01	12.934	-0.042	39	TS	0.0	
28		0.14	13.048	0.000	611	TS	0.0	
29	18:1w5	0.11	13.305	0.111	494	BB	3.6	
30	19:0 isobr	9.08	13.630	-0.014	39434	BB	4.5	
31	18:2w6		13.724					M
32		0.14	13.940	0.000	595	BP	3.2	
33	18:3w6	0.25	14.149	0.033	1102	PB	3.4	
34	19:0		14.330					M
35	18:3w4	0.98	14.806	0.080	4265	BB	3.4	
36	18:3w3		14.993					M
37		0.48	15.421	0.000	2072	BP	3.5	
38	18:4w3	0.08	15.655	0.014	354	PV	3.6	
39		0.30	15.741	0.000	1299	VB	4.7	
40	20:0	0.22	16.122	-0.379	959	BB	5.7	
41	20:1w11	2.85	16.605	-0.100	12379	BB	5.1	
42	20:1w9	0.13	16.768	-0.037	583	TS	0.0	
43	20:1w7	0.20	17.265	0.278	848	BB	4.9	
44	20:2w6	0.33	17.694	-0.257	1454	BB	4.8	
45	21:0	0.21	18.396	-0.287	893	BB	4.8	
46		2.02	19.038	0.000	8786	BB	5.3	
47	20:4w6	0.16	19.422	0.090	696	BB	5.5	
48	20:3w3		19.747					M
49	20:4w3	0.85	20.258	-0.369	3703	BB	6.4	
50		3.96	21.041	0.000	17191	BB	6.3	
51	20:5w3		21.505					M
52	22:0	1.70	21.937	-0.058	7402	BV	9.0	
53		0.66	22.119	0.000	2883	VB	10.3	
54	22:1w11		22.493					M
55	22:1w9		22.803					M
56		0.35	23.857	0.000	1504	BB	7.6	
57	21:5w3		25.415					M
58	23:0	0.33	26.146	0.177	1431	BB	9.7	
59	22:4w6		26.667					M
60	22:5w6	0.54	27.489	-0.613	2359	BB	10.1	
61	22:5w3	2.22	29.520	-0.681	9625	BB	11.1	
62	24:0	9.79	31.309	0.416	42541	BB	13.9	
63	22:6w3		32.026					M
64	24 :1w9		33.505					M
Totals:		99.97		-2.371	434333			

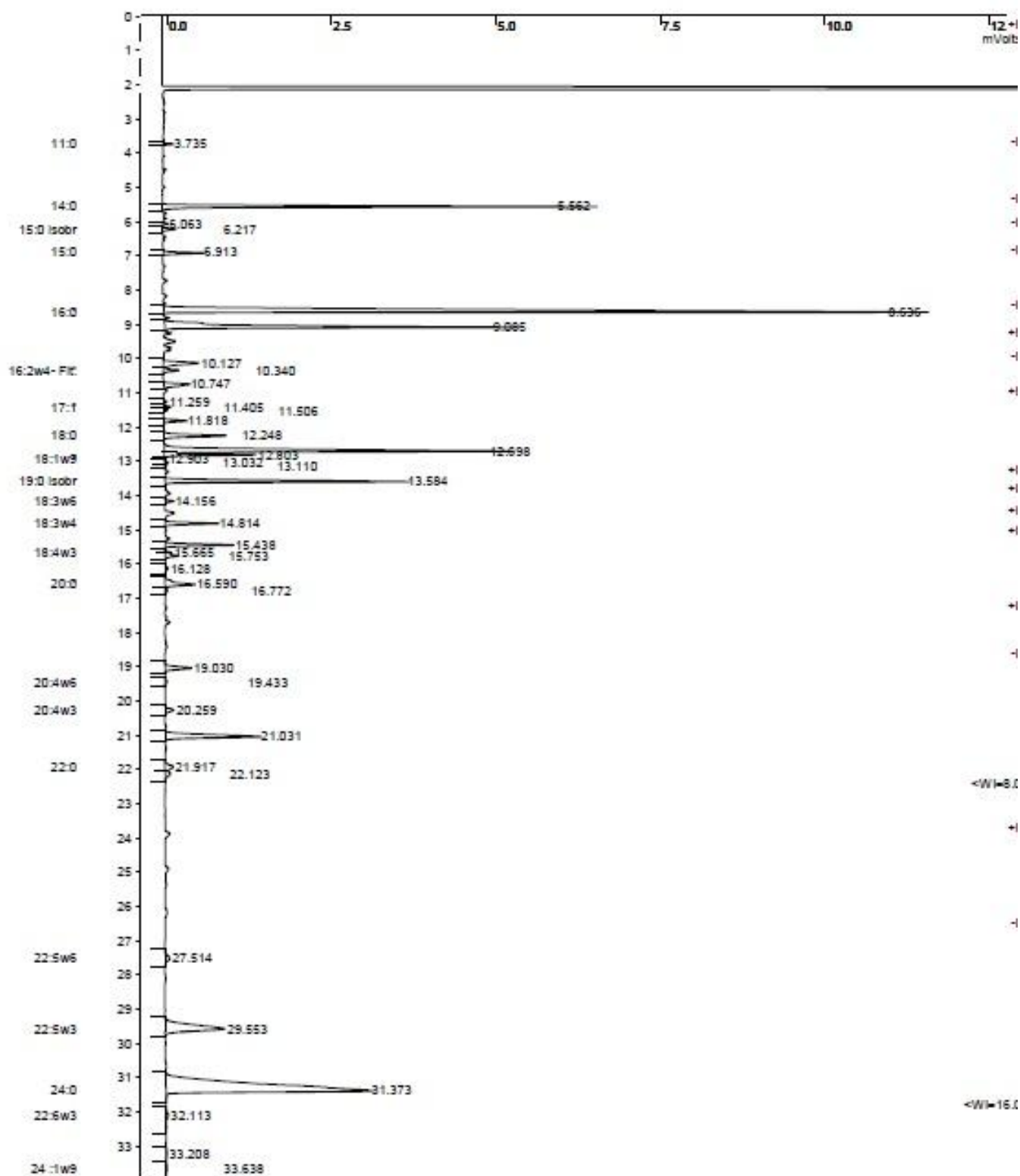
## Anexo VI: Cromatograma e relatório da fração DAG+CH de dourada crua bioacessível





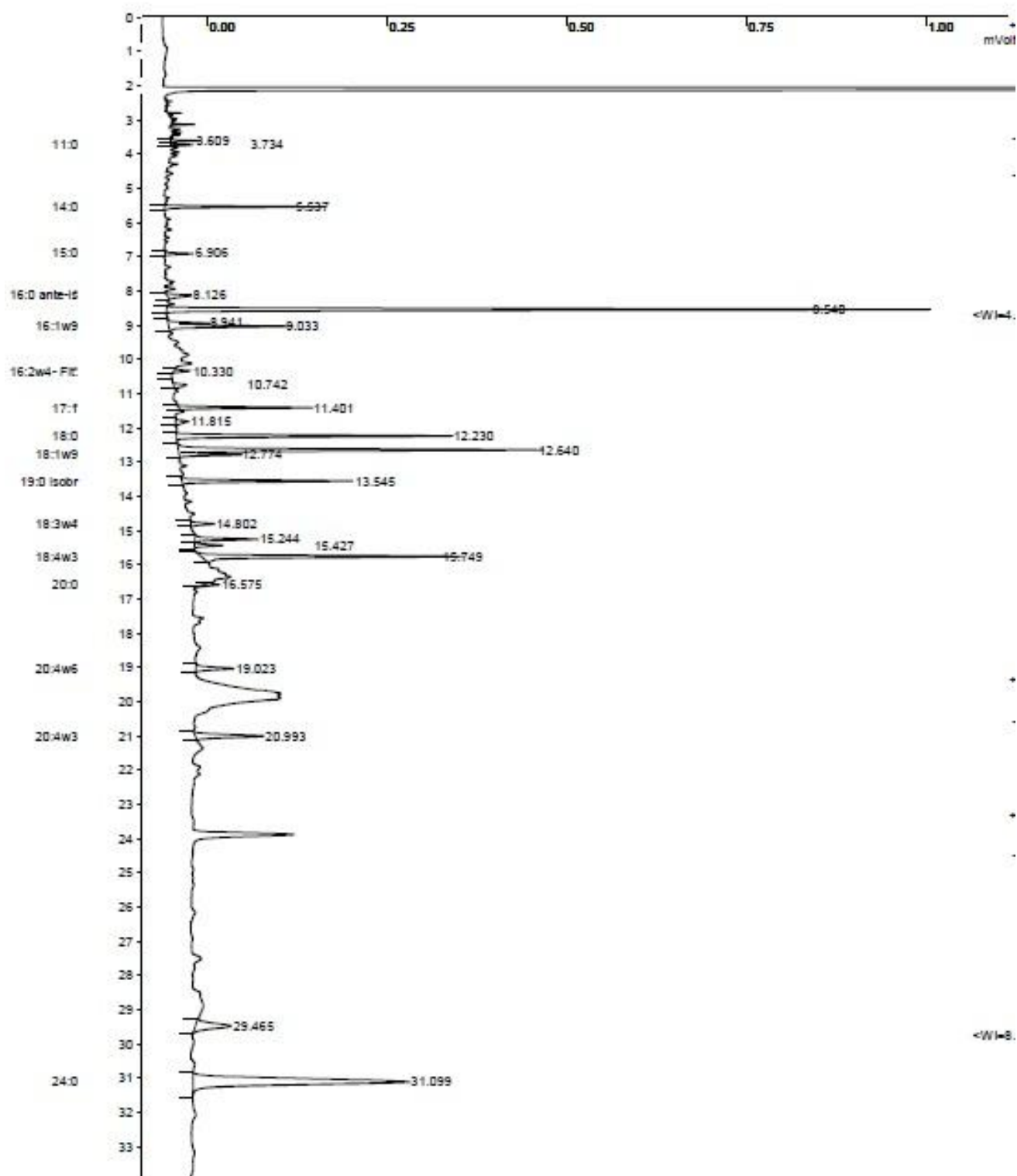
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.03	3.731	-0.035	8	BB	1.6	
2	12:0		4.064					M
3	13:0		4.536					M
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	2.13	5.533	-0.113	522	BB	2.5	
6	15:0 isobr		6.339					M
7	15:0 ante-is		6.647					M
8	15:0	0.38	6.905	-0.143	93	BB	3.0	
9	16:0 ante-is		8.227					M
10	16:0	15.54	8.537	-0.186	3812	BB	3.2	
11		0.41	8.929	0.000	102	BV	4.4	
12	16:1w9	5.67	9.031	-0.204	1391	VB	3.2	
13	16:1w7		9.275					M
14	17:0 isobr.		9.593					M
15		0.45	10.113	0.000	111	BV	5.1	
16	16:2w4- Fit.	0.54	10.328	0.053	133	VB	3.8	
17	17:0		10.481					M
18	16:3w4	0.66	10.785	-0.128	163	BB	4.3	
19	17:1	0.07	11.396	-0.014	17	BB	2.8	
20	16:3w3	0.09	11.807	0.132	23	BB	3.3	
21	16:4w3		11.993					M
22	18:0	6.13	12.227	-0.174	1503	BB	3.8	
23		25.63	12.650	0.000	6288	BV	3.7	
24	18:1w9	3.57	12.774	-0.094	875	VB	3.6	
25	18:1w7	0.11	13.019	0.043	28	BB	3.1	
26	18:1w5	0.11	13.282	0.088	28	BB	4.0	
27	19:0 isobr	9.19	13.545	-0.099	2254	BB	3.5	
28	18:2w6		13.724					M
29		0.14	13.933	0.000	35	BP	3.6	
30	18:3w6	0.27	14.147	0.031	66	PB	4.2	
31	19:0		14.330					M
32	18:3w4	1.01	14.799	0.073	247	BB	3.6	
33	18:3w3		14.993					M
34	18:4w3	0.53	15.423	-0.218	130	BB	3.5	
35		0.23	16.120	0.000	57	BB	4.6	
36	20:0	2.98	16.574	0.073	730	BB	5.0	
37	20:1w11		16.705					M
38	20:1w9	0.14	16.763	-0.042	33	TS	0.0	
39	20:1w7		16.987					M
40	20:2w6	0.34	17.696	-0.255	85	BB	4.6	
41	21:0	0.24	18.400	-0.283	58	BB	5.4	
42		2.12	19.021	0.000	520	BB	5.1	
43	20:4w6	0.18	19.421	0.089	44	BB	5.0	
44	20:3w3		19.747					M
45		0.95	20.254	0.000	233	BB	5.9	
46	20:4w3	4.24	20.993	0.366	1039	BB	5.9	
47	20:5w3		21.505					M
48	22:0	1.75	21.904	-0.091	429	BV	8.3	
49		0.65	22.110	0.000	159	VB	0.0	
50	22:1w11		22.493					M
51	22:1w9		22.803					M
52	21:5w3		25.415					M
53	23:0		25.969					M
54	22:4w6		26.667					M
55	22:5w6	0.58	27.486	-0.616	142	BB	9.1	
56		2.38	29.462	0.000	583	BB	10.4	
57	22:5w3		30.201					M
58	24:0	10.56	31.086	0.193	2591	BB	10.9	
59	22:6w3		32.026					M
60	24:1w9		33.505					M
Totals:		100.00		-1.554	24532			

## Anexo VII: Cromatograma e relatório da fração MAG de dourada crua bioacessível



Peak No.	Peak Name	Result (°)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.13	3.735	-0.031	322	BB	1.8	
2	12:0		4.064					M
3	13:0		4.536					M
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	8.21	5.562	-0.084	20023	BB	2.8	
6		0.08	6.063	0.000	200	BB	2.4	
7	15:0 isobr	0.27	6.217	-0.122	666	BB	2.9	
8	15:0 ante-is		6.647					M
9	15:0	0.87	6.913	-0.135	2115	BB	3.0	
10	16:0 ante-is		8.227					M
11	16:0	23.24	8.636	-0.087	56649	BB	4.7	
12	16:1w9	9.09	9.085	-0.150	22152	BB	3.3	
13	16:1w7		9.275					M
14	17:0 isobr.		9.593					M
15		1.25	10.127	0.000	3045	BV	5.1	
16	16:2w4- Fit.	0.43	10.340	0.065	1050	VB	3.8	
17	17:0		10.481					M
18	16:3w4	0.89	10.747	-0.166	2181	BB	5.5	
19		0.08	11.259	0.000	207	BV	3.8	
20	17:1	0.18	11.405	-0.005	448	VV	3.5	
21		0.09	11.506	0.000	221	VB	4.0	
22	16:3w3	0.53	11.818	0.143	1302	BB	3.3	
23	16:4w3		11.993					M
24	18:0	1.87	12.248	-0.153	4565	BP	4.4	
25		9.69	12.698	0.000	23629	PV	4.1	
26		2.02	12.803	0.000	4913	VB	3.3	
27	18:1w9	0.01	12.903	0.035	14	TS	0.0	
28	18:1w7	0.08	13.032	0.056	206	TF	0.0	
29	18:1w5	0.05	13.110	-0.084	121	TF	0.0	
30	19:0 isobr	5.92	13.584	-0.060	14443	BB	3.6	
31	18:2w6		13.724					M
32	18:3w6	0.23	14.156	0.040	549	BB	3.5	
33	19:0		14.330					M
34	18:3w4	1.26	14.814	0.088	3060	BB	3.4	
35	18:3w3		14.993					M
36		1.69	15.438	0.000	4119	BP	3.7	
37	18:4w3	0.14	15.665	0.024	350	PV	0.0	
38		0.36	15.753	0.000	869	VB	3.8	
39		0.09	16.128	0.000	221	BB	5.0	
40	20:0	1.19	16.590	0.089	2895	BB	4.9	
41	20:1w11		16.705					M
42	20:1w9	0.05	16.772	-0.033	133	TS	0.0	
43	20:1w7		16.987					M
44	20:2w6		17.951					M
45	21:0		18.683					M
46		0.95	19.030	0.000	2326	BB	5.2	
47	20:4w6	0.08	19.433	0.101	185	BB	5.6	
48	20:3w3		19.747					M
49	20:4w3	0.35	20.259	-0.368	846	BB	5.9	
50		3.70	21.031	0.000	9014	BB	5.8	
51	20:5w3		21.505					M
52	22:0	0.46	21.917	-0.079	1128	BV	8.9	
53		0.29	22.123	0.000	701	VB	10.5	
54	22:1w11		22.493					M
55	22:1w9		22.803					M
56	21:5w3		25.415					M
57	23:0		25.969					M
58	22:4w6		26.667					M
59	22:5w6	0.31	27.514	-0.588	759	BB	9.8	
60	22:5w3	4.30	29.553	-0.648	10479	BB	10.8	
61	24:0	19.18	31.373	0.480	46750	BB	14.1	
62	22:6w3	0.18	32.113	0.087	433	BB	10.5	
63		0.08	33.208	0.000	196	BV	12.6	
64	24 :1w9	0.12	33.638	0.133	302	VB	16.1	
Totals:		99.99		-1.452	243787			

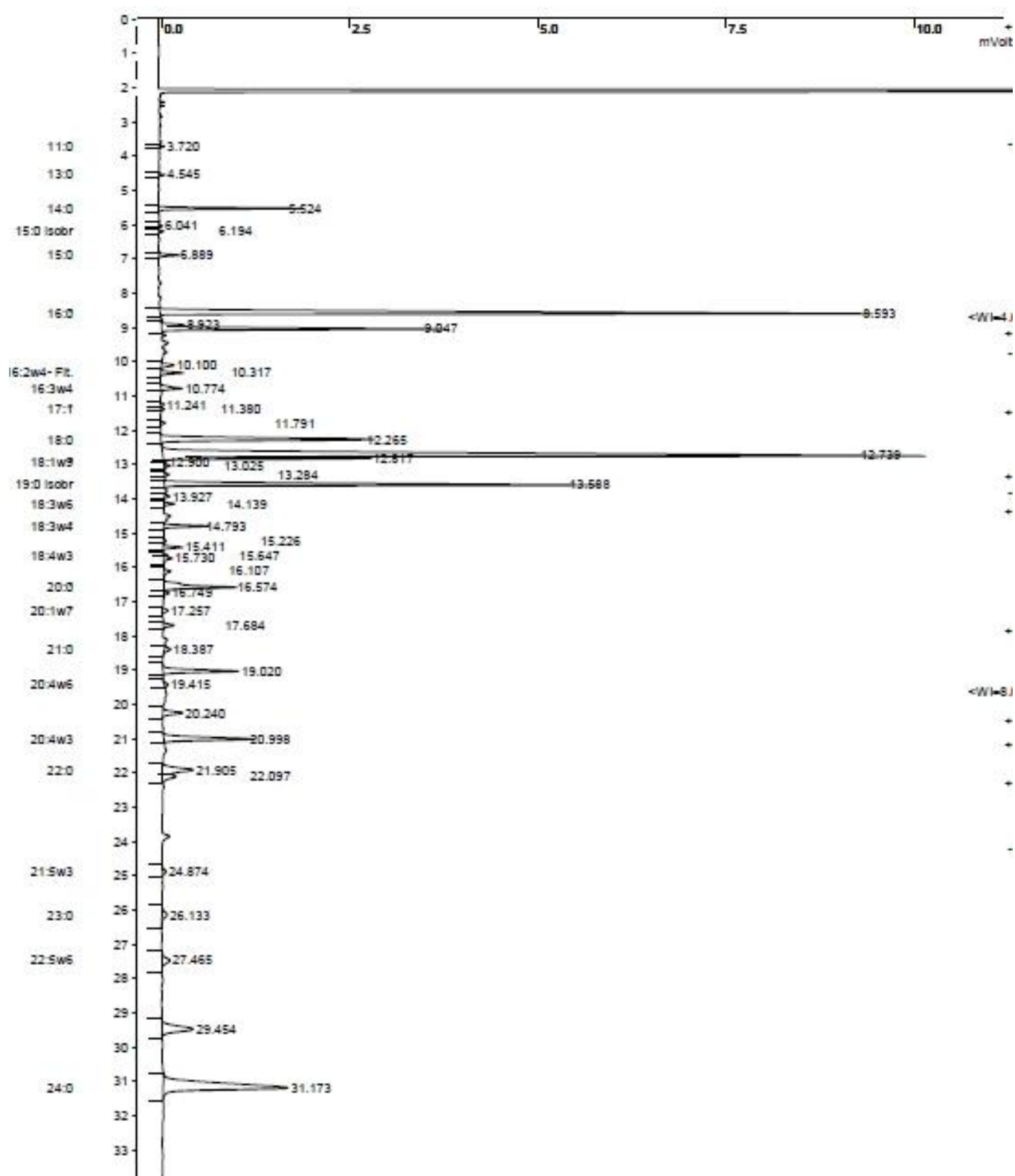
## Anexo VIII: Cromatograma e relatório da fração PL de dourada crua bioacessível





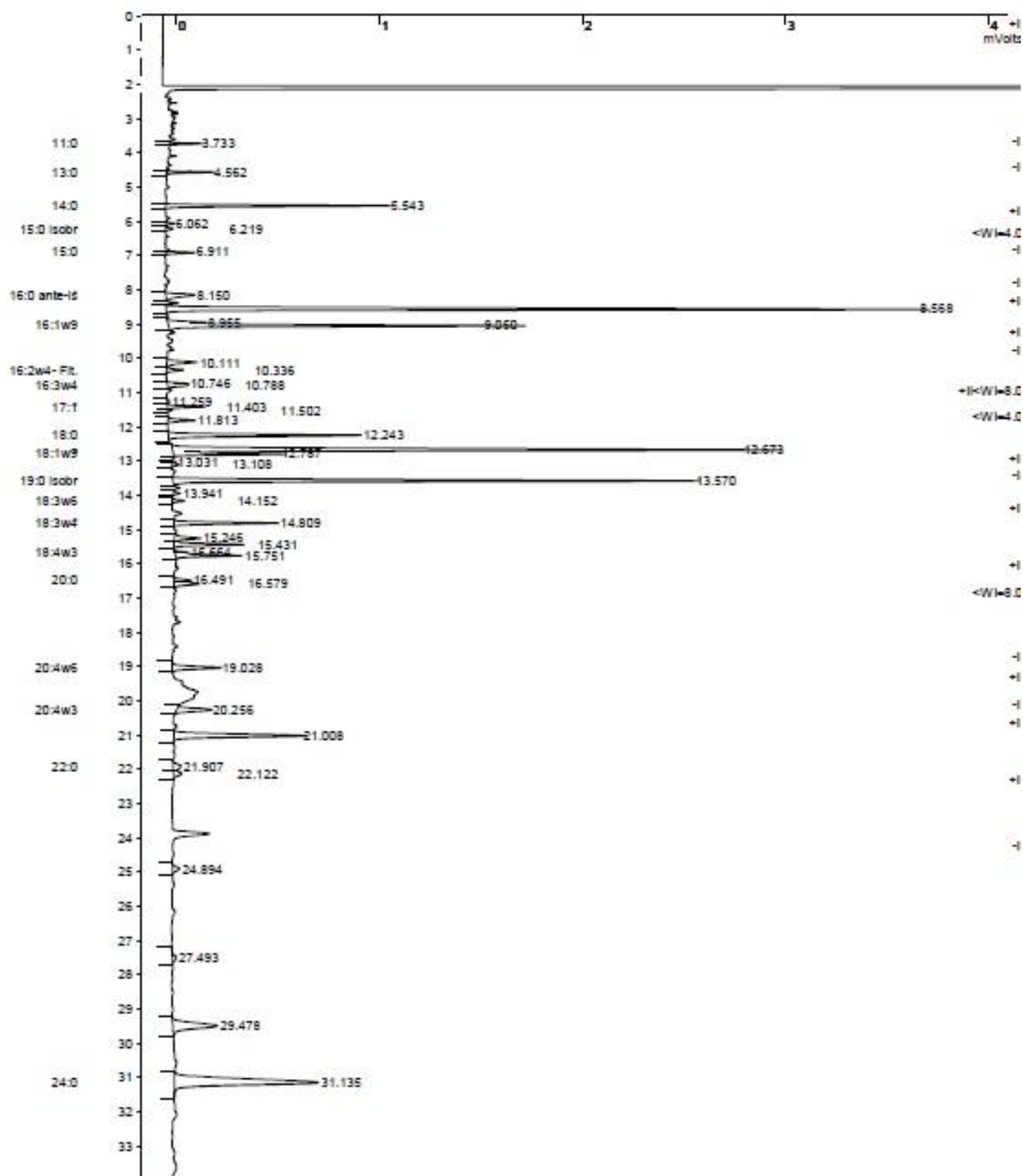
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.48	3.609	0.000	90	BV	2.0	
2	11:0	0.34	3.734	-0.033	63	VB	1.6	
3	12:0		4.064					M
4	13:0		4.536					M
5	14:0 isobr		5.063					M
6	14:0	3.26	5.537	-0.109	609	BB	2.5	
7	15:0 isobr		6.339					M
8	15:0 ante-is		6.647					M
9	15:0	0.63	6.906	-0.141	118	BB	2.8	
10	16:0 ante-is	1.03	8.126	-0.101	193	BB	0.0	
11	16:0	19.74	8.540	-0.183	3689	BB	3.2	
12		1.20	8.941	0.000	224	BV	3.9	
13	16:1w9	3.41	9.033	-0.202	637	VB	3.3	
14	16:1w7		9.275					M
15	17:0 isobr		9.593					M
16	16:2w4- Fit.	0.43	10.330	0.055	81	BB	3.3	
17	17:0		10.481					M
18	16:3w4	0.59	10.742	-0.171	110	BB	0.0	
19	17:1	3.45	11.401	-0.009	645	BB	3.2	
20	16:3w3	0.49	11.815	0.140	92	BB	0.0	
21	16:4w3		11.993					M
22	18:0	8.52	12.230	-0.171	1593	BB	3.8	
23		11.12	12.640	0.000	2078	BV	3.7	
24	18:1w9	1.92	12.774	-0.094	358	VB	3.9	
25	18:1w7		12.976					M
26	18:1w5		13.194					M
27	19:0 isobr	4.87	13.545	-0.099	910	BB	3.5	
28	18:2w6		13.724					M
29	18:3w6		14.116					M
30	19:0		14.330					M
31	18:3w4	0.71	14.802	0.076	132	BB	3.8	
32	18:3w3	1.94	15.244	0.251	362	BV	3.7	
33		0.83	15.427	0.000	156	VB	3.4	
34	18:4w3	8.53	15.749	0.108	1595	BB	4.0	
35	20:0	0.38	16.575	0.074	71	BB	2.5	
36	20:1w11		16.705					M
37	20:1w9		16.805					M
38	20:1w7		16.987					M
39	20:2w6		17.951					M
40	21:0		18.683					M
41	20:4w6	1.53	19.023	-0.309	286	BB	4.9	
42	20:3w3		19.747					M
43	20:4w3	3.16	20.993	0.366	590	BB	5.9	
44	20:5w3		21.505					M
45	22:0		21.995					M
46	22:1w11		22.493					M
47	22:1w9		22.803					M
48	21:5w3		25.415					M
49	23:0		25.969					M
50	22:4w6		26.667					M
51	22:5w6		28.102					M
52		2.79	29.465	0.000	521	BB	9.1	
53	22:5w3		30.201					M
54	24:0	18.64	31.099	0.206	3482	BB	10.8	
55	22:6w3		32.026					M
56	24 :1w9		33.505					M
Totals:		99.99		-0.346	18685			

## Anexo IX: Cromatograma e relatório da fração FFA de dourada grelhada bioacessível



Peak No.	Peak Name	Result (i)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.06	3.720	-0.046	131	BB	1.7	
2	12:0		4.064					M
3	13:0	0.09	4.545	0.009	206	BB	2.2	
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	2.36	5.524	-0.122	5529	BB	2.7	
6		0.06	6.041	0.000	148	BB	2.6	
7	15:0 isobr	0.09	6.194	-0.145	204	BB	2.9	
8	15:0 ante-is		6.647					M
9	15:0	0.37	6.889	-0.159	878	BB	3.0	
10	16:0 ante-is		8.227					M
11	16:0	17.79	8.593	-0.130	41646	BB	4.2	
12		0.50	8.923	0.000	1181	BV	4.2	
13	16:1w9	5.75	9.047	-0.188	13461	VB	3.3	
14	16:1w7		9.275					M
15	17:0 isobr.		9.593					M
16		0.36	10.100	0.000	840	BP	4.5	
17	16:2w4- Fit.	0.55	10.317	0.042	1281	PB	3.7	
18	17:0		10.481					M
19	16:3w4	0.62	10.774	-0.139	1448	BB	4.4	
20		0.09	11.241	0.000	221	BV	5.0	
21	17:1	0.07	11.380	-0.030	173	VB	3.6	
22	16:3w3	0.09	11.791	0.116	219	BB	3.5	
23	16:4w3		11.993					M
24	18:0	6.81	12.265	-0.136	15942	BP	5.4	
25		24.94	12.739	0.000	58378	PV	5.5	
26		3.37	12.817	0.000	7898	VB	2.8	
27	18:1w9	0.02	12.900	0.032	43	TS	0.0	
28	18:1w7	0.13	13.025	0.049	294	TS	0.0	
29	18:1w5	0.10	13.284	0.090	233	BB	3.6	
30	19:0 isobr	9.82	13.588	-0.056	22996	BB	3.7	
31	18:2w6		13.724					M
32		0.12	13.927	0.000	279	BB	3.2	
33	18:3w6	0.25	14.139	0.023	578	BB	3.6	
34	19:0		14.330					M
35	18:3w4	0.94	14.793	0.068	2190	BB	3.4	
36	18:3w3	0.06	15.226	0.233	150	BV	3.5	
37		0.42	15.411	0.000	994	VB	3.5	
38	18:4w3	0.09	15.647	0.006	208	BV	3.7	
39		0.26	15.730	0.000	603	VB	4.5	
40		0.25	16.107	0.000	593	BV	4.9	
41	20:0	2.53	16.574	0.073	5923	VB	4.7	
42	20:1w11	0.13	16.749	0.044	298	TS	0.0	
43	20:1w9		16.805					M
44	20:1w7	0.17	17.257	0.270	394	BB	4.7	
45	20:2w6	0.32	17.684	-0.267	745	BB	4.9	
46	21:0	0.24	18.387	-0.296	555	BB	5.3	
47		2.35	19.020	0.000	5510	BB	5.1	
48	20:4w6	0.13	19.415	0.083	302	BB	6.5	
49	20:3w3		19.747					M
50		0.74	20.240	0.000	1734	BB	6.0	
51	20:4w3	3.16	20.998	0.371	7395	BB	5.7	
52	20:5w3		21.505					M
53	22:0	1.53	21.905	-0.090	3585	BV	8.4	
54		0.60	22.097	0.000	1400	VB	10.1	
55	22:1w11		22.493					M
56	22:1w9		22.803					M
57	21:5w3	0.17	24.874	-0.541	392	BB	7.9	
58	23:0	0.31	26.133	0.164	736	BB	9.6	
59	22:4w6		26.667					M
60	22:5w6	0.50	27.465	-0.637	1163	BB	9.7	
61		1.98	29.454	0.000	4643	BB	10.5	
62	22:5w3		30.201					M
63	24:0	8.69	31.173	0.280	20352	BB	11.4	
64	22:6w3		32.026					M
65	24 :1w9		33.505					M
Totals:		99.98		-1.029	234072			

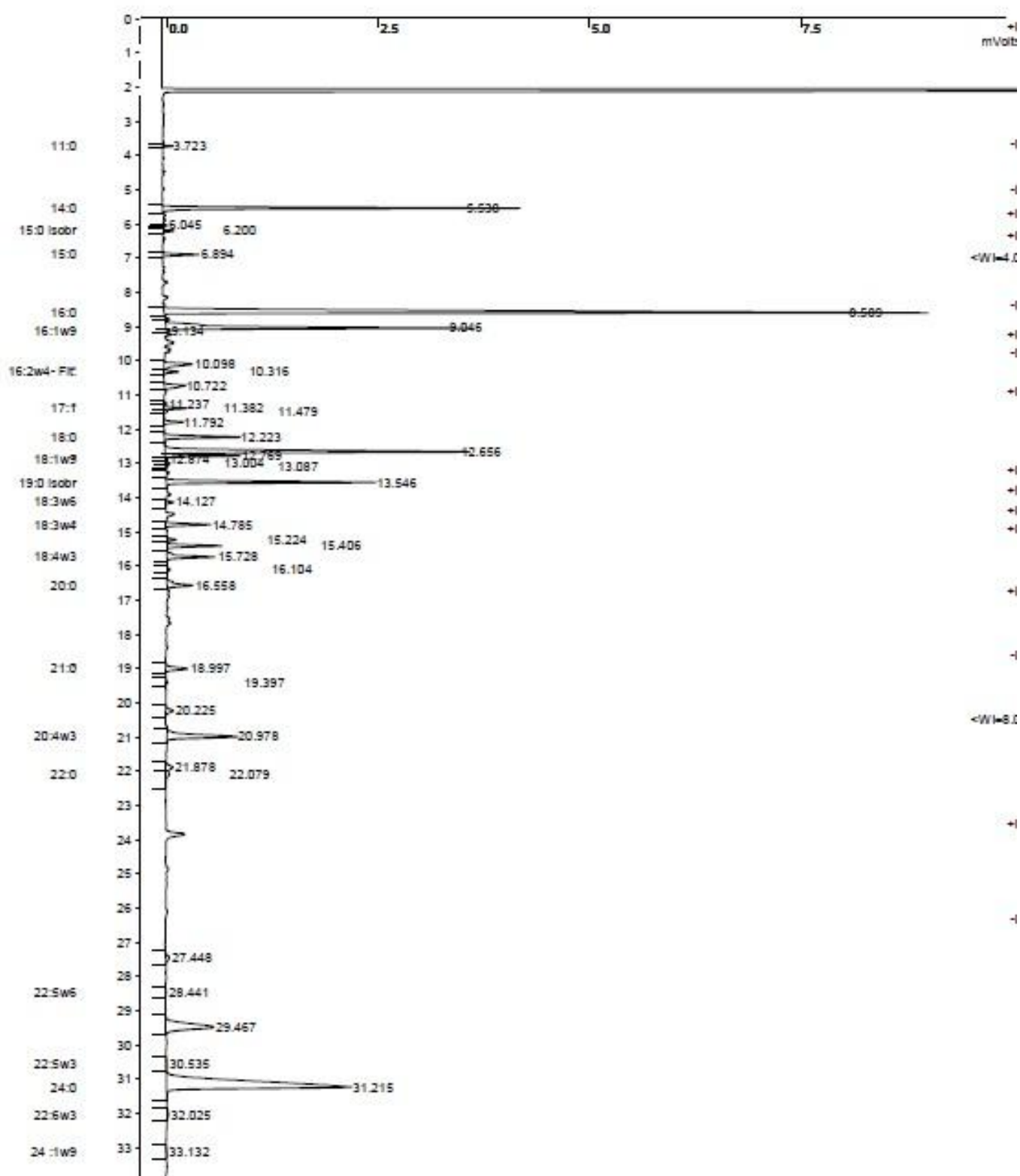
## Anexo X: Cromatograma e relatório da fração DAG+CH de dourada grelhada bioacessível





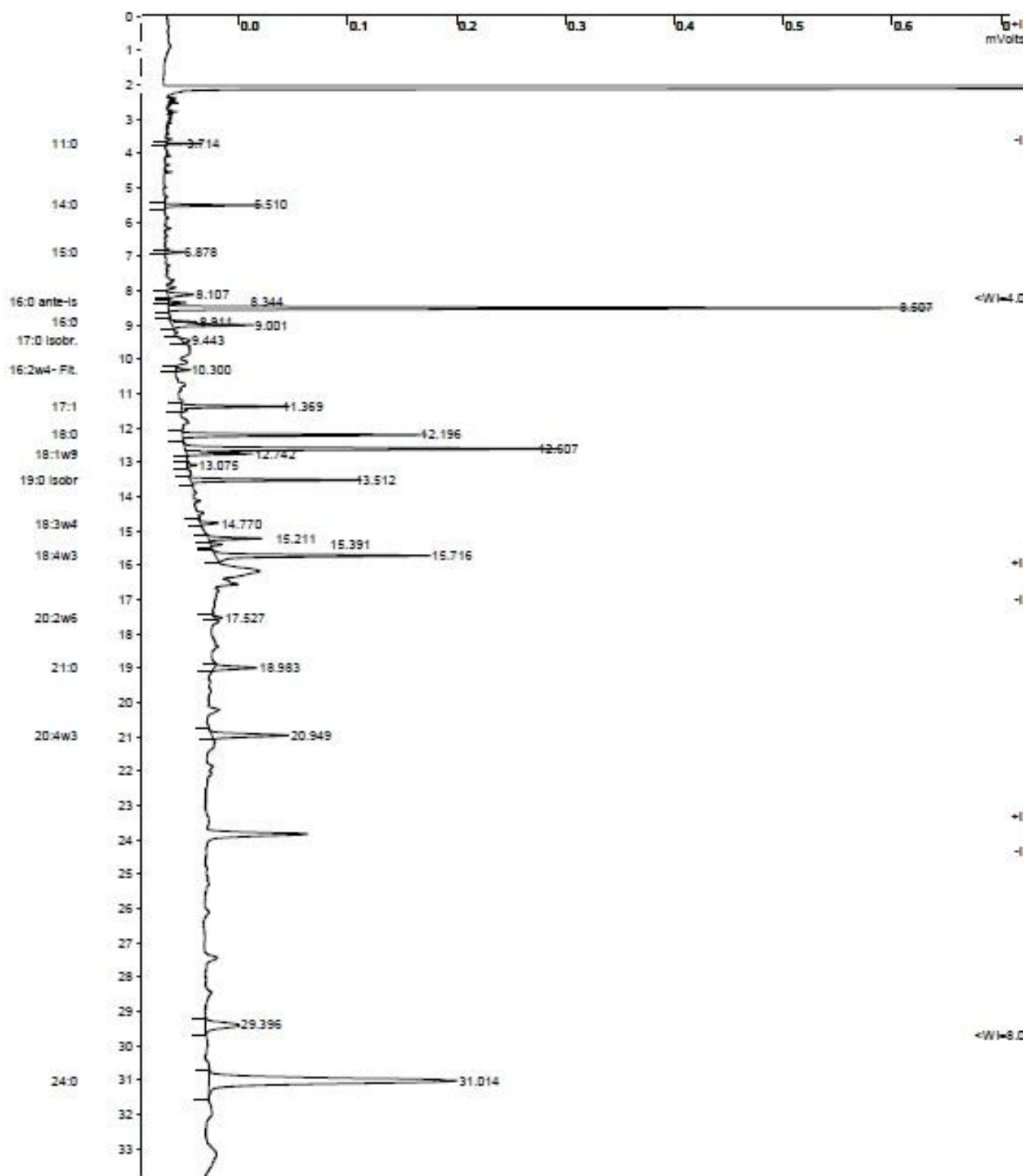
Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.38	3.733	-0.033	327	BB	1.8	
2	12:0		4.064					M
3	13:0	0.69	4.562	0.026	597	BB	2.3	
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	3.95	5.543	-0.102	3421	BB	2.8	
6		0.15	6.062	0.000	126	BB	2.7	
7	15:0 isobr	0.17	6.219	-0.120	145	BB	3.3	
8	15:0 ante-is		6.626					M
9	15:0	0.53	6.911	-0.136	462	BB	3.0	
10	16:0 ante-is	1.03	8.150	-0.077	891	BB	5.7	
11	16:0	16.88	8.568	-0.155	14619	BB	3.6	
12		0.77	8.955	0.000	665	BV	5.4	
13	16:1w9	7.58	9.050	-0.185	6565	VB	3.3	
14	16:1w7		9.275					M
15	17:0 isobr.		9.593					M
16		0.86	10.111	0.000	741	BV	4.3	
17	16:2w4- Fit.	0.45	10.336	0.061	387	VB	3.8	
18	17:0		10.481					M
19		0.44	10.746	0.000	379	BV	4.1	
20	16:3w4	0.40	10.788	-0.125	348	VB	6.7	
21		0.05	11.259	0.000	47	BV	4.2	
22	17:1	0.83	11.403	-0.007	718	VV	3.5	
23		0.10	11.502	0.000	85	VB	4.2	
24	16:3w3	0.60	11.813	0.138	522	BB	3.4	
25	16:4w3		11.993					M
26	18:0	5.02	12.243	-0.158	4344	BB	4.2	
27		14.98	12.673	0.000	12975	BV	4.1	
28	18:1w9	2.39	12.787	-0.081	2069	VB	3.6	
29	18:1w7	0.07	13.031	0.055	63	BV	3.4	
30	18:1w5	0.17	13.108	-0.086	146	VB	3.4	
31	19:0 isobr	11.83	13.570	-0.074	10248	BB	3.7	
32	18:2w6		13.724					M
33		0.14	13.941	0.000	119	BB	3.0	
34	18:3w6	0.29	14.152	0.036	248	BB	3.6	
35	19:0		14.330					M
36	18:3w4	2.26	14.809	0.083	1954	BB	3.6	
37	18:3w3	0.76	15.246	0.253	660	BV	4.3	
38		1.63	15.431	0.000	1408	VP	3.7	
39	18:4w3	0.24	15.664	0.023	211	PV	3.4	
40		1.59	15.751	0.000	1375	VB	3.8	
41	20:0	0.49	16.491	-0.010	421	BV	5.5	
42		0.79	16.579	0.000	683	VB	6.4	
43	20:1w11		16.705					M
44	20:1w9		16.805					M
45	20:1w7		16.987					M
46	20:2w6		17.951					M
47	21:0		18.683					M
48	20:4w6	1.58	19.028	-0.304	1366	BB	5.2	
49	20:3w3		19.747					M
50	20:4w3	1.27	20.256	-0.371	1101	BB	5.8	
51		4.79	21.008	0.000	4148	BB	6.0	
52	20:5w3		21.505					M
53	22:0	0.45	21.907	-0.088	392	BV	9.1	
54		0.41	22.122	0.000	351	VB	9.2	
55	22:1w11		22.493					M
56	22:1w9		22.803					M
57		0.33	24.894	0.000	288	BB	8.2	
58	21:5w3		25.415					M
59	23:0		25.969					M
60	22:4w6		26.667					M
61		0.25	27.493	0.000	213	BB	10.9	
62	22:5w6		28.102					M
63		2.82	29.478	0.000	2440	BB	10.3	
64	22:5w3		30.201					M
65	24:0	9.63	31.135	0.242	8340	BB	10.9	
66	22:6w3		32.026					M
67	24 :1w9		33.505					M
Totals:		100.04		-1.195	86608			

## Anexo XI: Cromatograma e relatório da fração MAG de dourada grelhada bioacessível



Peak No.	Peak Name	Result (°)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.14	3.723	-0.043	232	BB	1.8	
2	12:0		4.064					M
3	13:0		4.536					M
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	7.95	5.538	-0.108	12905	BB	2.8	
6		0.07	6.045	0.000	118	BB	2.3	
7	15:0 isobr	0.27	6.200	-0.139	443	BB	2.9	
8	15:0 ante-is		6.647					M
9	15:0	0.88	6.894	-0.154	1428	BB	3.1	
10	16:0 ante-is		8.227					M
11	16:0	24.36	8.589	-0.134	39528	BB	4.2	
12		8.86	9.046	0.000	14376	BB	3.2	
13	16:1w9	0.02	9.134	-0.101	35	TS	0.0	
14	16:1w7		9.275					M
15	17:0 isobr.		9.593					M
16		1.18	10.098	0.000	1913	BV	5.1	
17	16:2w4- Fit.	0.45	10.316	0.041	735	VB	3.6	
18	17:0		10.481					M
19	16:3w4	0.86	10.722	-0.191	1400	BB	5.8	
20		0.09	11.237	0.000	151	BV	4.1	
21	17:1	0.61	11.382	-0.028	995	VV	3.4	
22		0.08	11.479	0.000	132	VV	4.2	
23	16:3w3	0.52	11.792	0.116	843	VB	3.3	
24	16:4w3		11.993					M
25	18:0	2.47	12.223	-0.178	4004	BP	4.1	
26		9.60	12.656	0.000	15578	PV	4.0	
27		2.07	12.769	0.000	3356	VB	3.3	
28	18:1w9	0.01	12.874	0.006	10	TS	0.0	
29	18:1w7	0.10	13.004	0.028	164	TF	0.0	
30	18:1w5	0.04	13.087	-0.107	69	TF	0.0	
31	19:0 isobr	5.81	13.546	-0.098	9429	BB	3.5	
32	18:2w6		13.724					M
33	18:3w6	0.23	14.127	0.011	371	BB	3.5	
34	19:0		14.330					M
35	18:3w4	1.19	14.785	0.059	1932	BB	3.5	
36	18:3w3	0.27	15.224	0.231	443	BV	3.6	
37		1.56	15.406	0.000	2532	VP	3.7	
38	18:4w3	1.56	15.728	0.087	2539	PB	3.7	
39		0.09	16.104	0.000	150	BB	4.3	
40	20:0	1.11	16.558	0.057	1803	BB	4.7	
41	20:1w11		16.705					M
42	20:1w9		16.805					M
43	20:1w7		16.987					M
44	20:2w6		17.951					M
45	21:0	0.87	18.997	0.313	1416	BB	5.0	
46	20:4w6	0.08	19.397	0.065	129	BB	5.6	
47	20:3w3		19.747					M
48		0.42	20.225	0.000	674	BB	6.4	
49	20:4w3	3.43	20.978	0.351	5561	BB	6.0	
50	20:5w3		21.505					M
51		0.45	21.878	0.000	729	BV	8.2	
52	22:0	0.26	22.079	0.083	417	VB	10.0	
53	22:1w11		22.493					M
54	22:1w9		22.803					M
55	21:5w3		25.415					M
56	23:0		25.969					M
57	22:4w6		26.667					M
58		0.26	27.448	0.000	428	BB	9.8	
59	22:5w6	0.05	28.441	0.339	78	BB	9.2	
60		3.97	29.467	0.000	6434	BB	10.5	
61	22:5w3	0.08	30.535	0.334	124	BV	12.0	
62	24:0	17.47	31.215	0.322	28342	VB	12.5	
63	22:6w3	0.13	32.025	-0.001	210	BB	10.6	
64	24 :1w9	0.07	33.132	-0.373	119	BB	0.0	
Totals:		99.99		0.788	162275			

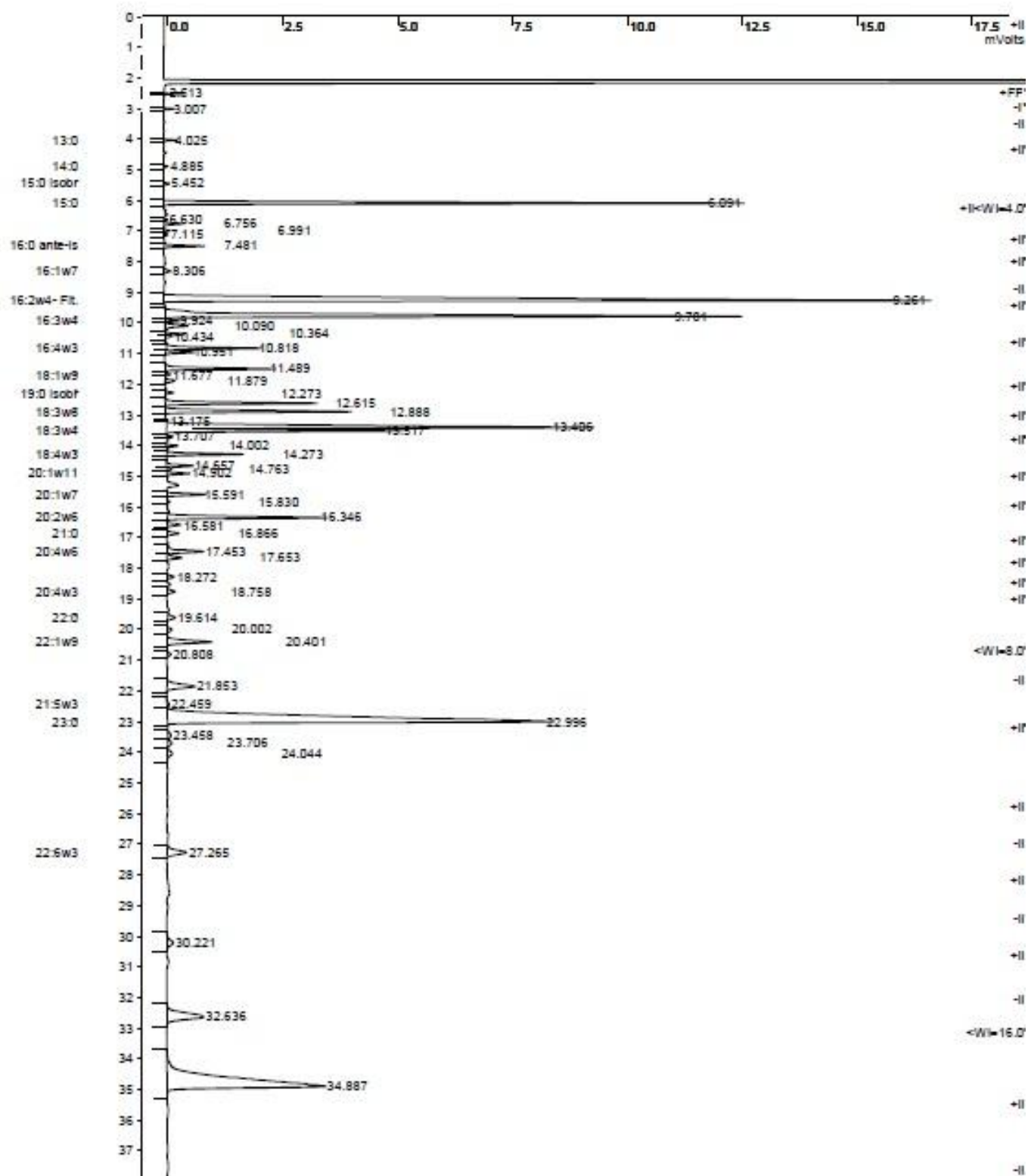
## Anexo XII: Cromatograma e relatório da fração PL de dourada grelhada bioacessível





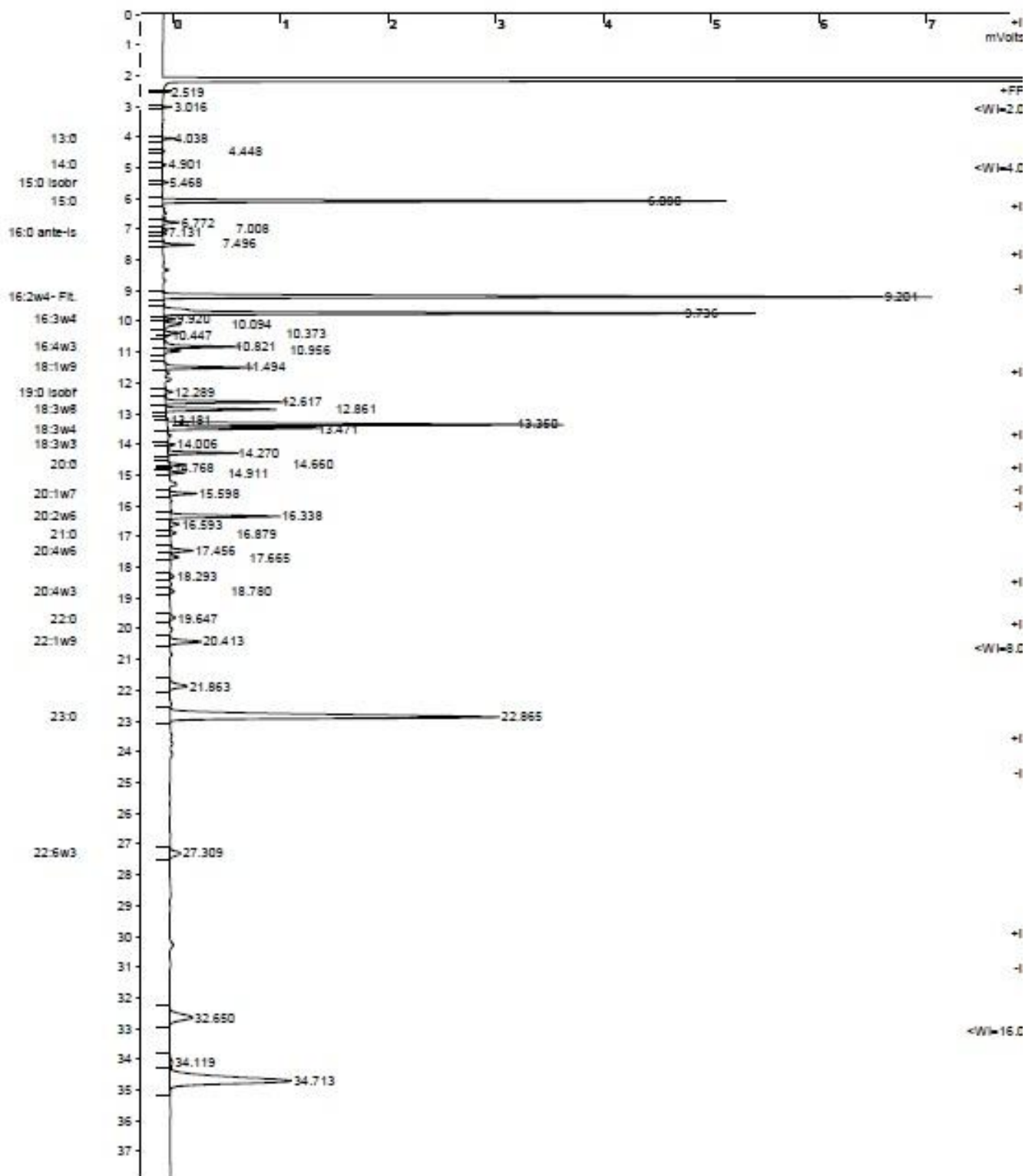
Peak No.	Peak Name	Result (g)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.48	3.714	-0.052	57	BB	1.6	
2	12:0		4.064					M
3	13:0		4.536					M
4	14:0 isobr		5.063					M
5	14:0	2.09	5.510	-0.136	245	BB	2.5	
6	15:0 isobr		6.339					M
7	15:0 ante-is		6.647					M
8	15:0	0.40	6.878	-0.170	47	BB	2.6	
9		1.15	8.107	0.000	135	BB	5.3	
10	16:0 ante-is	0.45	8.344	0.117	53	BP	3.0	
11		20.20	8.507	0.000	2376	FB	3.2	
12	16:0	0.85	8.911	0.188	100	BV	4.4	
13	16:1w9	2.34	9.001	-0.234	275	VB	3.4	
14	16:1w7		9.275					M
15	17:0 isobr	0.42	9.443	-0.150	50	BB	0.0	
16	16:2w4- Fit.	0.42	10.300	0.025	49	BB	3.4	
17	17:0		10.481					M
18	16:3w4		10.913					M
19	17:1	3.19	11.369	-0.041	375	BB	3.4	
20	16:3w3		11.675					M
21	16:4w3		11.993					M
22	18:0	7.67	12.196	-0.205	902	BB	3.7	
23		11.90	12.607	0.000	1399	BV	3.7	
24	18:1w9	1.98	12.742	-0.126	233	VB	3.8	
25	18:1w7	0.26	13.075	0.099	30	BB	3.1	
26	18:1w5		13.194					M
27	19:0 isobr	5.11	13.512	-0.132	600	BB	3.6	
28	18:2w6		13.724					M
29	18:3w6		14.116					M
30	19:0		14.330					M
31	18:3w4	0.58	14.770	0.044	68	BB	3.9	
32	18:3w3	1.74	15.211	0.218	205	BV	3.9	
33		0.35	15.391	0.000	41	VB	4.4	
34	18:4w3	7.37	15.716	0.075	867	BB	3.8	
35	20:0		16.501					M
36	20:1w11		16.705					M
37	20:1w9		16.805					M
38	20:1w7		16.987					M
39	20:2w6	0.22	17.527	-0.424	26	BB	0.0	
40	21:0	1.79	18.983	0.300	210	BB	5.0	
41	20:4w6		19.332					M
42	20:3w3		19.747					M
43	20:4w3	3.72	20.949	0.322	437	BB	5.9	
44	20:5w3		21.505					M
45	22:0		21.995					M
46	22:1w11		22.493					M
47	22:1w9		22.803					M
48	21:5w3		25.415					M
49	23:0		25.969					M
50	22:4w6		26.667					M
51	22:5w6		28.102					M
52		2.86	29.396	0.000	337	BB	10.4	
53	22:5w3		30.201					M
54	24:0	22.48	31.014	0.121	2643	BB	10.7	
55	22:6w3		32.026					M
56	24 :1w9		33.505					M
Totals:		100.02		-0.161	11760			

## Anexo XIII: Cromatograma e relatório do suplemento alimentar inicial



Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.11	2.513	0.000	638	BB	1.4	
2		0.07	3.007	0.000	425	BB	1.6	
3	11:0		3.447					M
4	12:0		3.750					M
5	13:0	0.12	4.025	-0.039	709	BB	2.2	
6	14:0 isobr		4.536					M
7	14:0	0.05	4.885	-0.082	280	BB	2.7	
8	15:0 isobr	0.07	5.452	-0.114	425	BB	2.9	
9	15:0 ante-is		5.761					M
10	15:0	7.28	6.091	-0.102	43240	BB	3.2	
11		0.04	6.630	0.000	244	BV	3.0	
12		0.25	6.756	0.000	1477	VP	3.2	
13		0.08	6.991	0.000	453	PV	3.3	
14		0.05	7.115	0.000	325	VB	3.3	
15	16:0 ante-is	0.52	7.481	0.174	3078	BB	3.3	
16	16:0		7.733					M
17	16:1w9		8.078					M
18	16:1w7	0.11	8.306	0.118	675	BB	4.3	
19	17:0 isobr.		8.588					M
20	16:2w4- Fit.	15.87	9.261	0.058	94268	BB	5.4	
21	17:0		9.423					M
22		10.67	9.781	0.000	63341	BB	4.5	
23	16:3w4	0.18	9.924	0.068	1087	TF	0.0	
24		0.47	10.090	0.000	2790	TF	0.0	
25	17:1	0.29	10.364	0.051	1698	TF	0.0	
26		0.08	10.434	0.000	484	TF	0.0	
27	16:3w3		10.594					M
28	16:4w3	1.44	10.818	-0.020	8534	BV	3.7	
29		0.40	10.951	0.000	2368	VB	3.3	
30	18:0		11.269					M
31		1.85	11.489	0.000	10975	BB	3.9	
32	18:1w9	0.06	11.677	-0.030	339	TS	0.0	
33	18:1w7	0.20	11.879	0.078	1161	TS	0.0	
34	18:1w5		12.030					M
35	19:0 isobr	0.13	12.273	-0.008	790	BP	3.7	
36	18:2w6	2.27	12.615	0.060	13496	PV	3.8	
37	18:3w6	3.03	12.888	-0.023	17985	VB	4.2	
38	19:0	0.00	13.175	0.055	22	BV	1.8	
39		8.80	13.406	0.000	52293	VV	5.4	
40	18:3w4	3.21	13.517	0.029	19090	VP	3.6	
41	18:3w3	0.08	13.707	-0.052	476	PS	0.0	
42		0.17	14.002	0.000	990	BB	3.7	
43	18:4w3	1.14	14.273	-0.082	6790	BB	3.8	
44	20:0	0.44	14.657	0.004	2592	BV	3.9	
45		0.07	14.763	0.000	426	VV	4.6	
46	20:1w11	0.34	14.902	-0.122	2016	VB	3.8	
47	20:1w9		15.421					M
48	20:1w7	0.63	15.591	0.007	3767	BB	4.1	
49		0.05	15.830	0.000	322	BB	4.2	
50	20:2w6	2.86	16.346	-0.039	16968	BP	4.5	
51		0.23	16.581	0.000	1385	PS	0.0	
52	21:0	0.22	16.866	-0.119	1319	BB	4.7	
53	20:4w6	0.78	17.453	-0.052	4619	BV	5.2	
54		0.30	17.653	0.000	1800	VB	5.0	
55	20:3w3		17.856					M
56		0.16	18.272	0.000	938	BB	5.4	
57	20:4w3	0.18	18.758	0.201	1065	BB	5.5	
58	20:5w3		19.177					M
59	22:0	0.20	19.614	0.013	1176	BB	6.1	
60	22:1w11	0.12	20.002	0.023	738	BV	6.3	
61	22:1w9	1.14	20.401	0.260	6794	VB	6.3	
62		0.09	20.808	0.000	548	BB	6.5	
63		0.93	21.853	0.000	5498	BB	8.2	
64	21:5w3	0.08	22.459	-0.003	471	BV	11.7	
65	23:0	17.27	22.996	0.346	102573	VB	11.6	
66	22:4w6	0.11	23.458	-0.076	668	BV	9.1	
67		0.15	23.706	0.000	869	VV	8.1	
68		0.19	24.044	0.000	1147	VB	8.5	
69	22:5w6		24.644					M
70	24:0		25.582					M
71	22:5w3		26.304					M
72	22:6w3	0.72	27.265	-0.430	4251	BB	9.4	
73	24 :1w9		28.155					M
74		0.29	30.221	0.000	1733	BB	11.1	
75		1.94	32.636	0.000	11551	BB	13.3	
76		11.40	34.887	0.000	67729	BB	18.1	
Totals:		99.98		0.152	593909			

## Anexo XIV: Cromatograma e relatório do suplemento alimentar bioacessível





Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.06	2.519	0.000	97	BB	1.3	
2		0.09	3.016	0.000	162	BB	1.7	
3	11:0		3.447					M
4	12:0		3.750					M
5	13:0	0.20	4.038	-0.026	349	BB	2.6	
6	14:0 isobr	0.04	4.448	-0.088	75	BB	2.8	
7	14:0	0.08	4.901	-0.067	133	BB	3.3	
8	15:0 isobr	0.11	5.468	-0.098	191	BB	3.3	
9	15:0 ante-is		5.761					M
10	15:0	10.02	6.080	-0.113	17688	BB	3.2	
11		0.32	6.772	0.000	562	BB	3.5	
12		0.10	7.008	0.000	182	BV	3.5	
13	16:0 ante-is	0.08	7.131	-0.176	135	VB	3.7	
14		0.62	7.496	0.000	1086	BB	3.5	
15	16:0		7.733					M
16	16:1w9		8.078					M
17	16:1w7		8.187					M
18	17:0 isobr		8.588					M
19	16:2w4- Fit.	16.42	9.201	-0.002	28963	BB	3.9	
20	17:0		9.423					M
21		12.62	9.736	0.000	22265	BP	3.6	
22	16:3w4	0.22	9.920	0.064	381	TF	0.0	
23		0.52	10.094	0.000	916	TF	0.0	
24	17:1	0.34	10.373	0.060	599	TF	0.0	
25		0.09	10.447	0.000	159	TF	0.0	
26	16:3w3		10.594					M
27	16:4w3	1.76	10.821	-0.017	3099	PV	3.8	
28		0.34	10.956	0.000	607	VB	3.7	
29	18:0		11.269					M
30	18:1w9	2.01	11.494	-0.213	3548	BB	4.0	
31	18:1w7		11.801					M
32	18:1w5		12.030					M
33	19:0 isobr	0.16	12.289	0.008	286	BB	3.8	
34	18:2w6	2.67	12.617	0.062	4704	BV	3.8	
35	18:3w6	2.38	12.861	-0.050	4198	VB	3.8	
36	19:0	0.04	13.181	0.061	70	BV	4.9	
37		8.90	13.350	0.000	15702	VV	4.0	
38	18:3w4	3.08	13.471	-0.017	5430	VB	3.6	
39	18:3w3	0.18	14.006	0.247	309	BV	4.1	
40	18:4w3	1.55	14.270	-0.085	2741	VB	3.8	
41	20:0	0.36	14.660	0.007	633	BP	4.0	
42		0.00	14.768	0.000	7	PS	0.0	
43	20:1w11	0.33	14.911	-0.113	587	BB	3.7	
44	20:1w9		15.421					M
45	20:1w7	0.62	15.598	0.014	1094	BB	4.0	
46	20:2w6	2.80	16.338	-0.047	4948	BB	4.6	
47		0.25	16.593	0.000	447	BV	4.6	
48	21:0	0.15	16.879	-0.106	266	VB	4.5	
49	20:4w6	0.67	17.456	-0.049	1177	BV	4.8	
50		0.25	17.665	0.000	447	VB	4.9	
51	20:3w3		17.856					M
52		0.14	18.293	0.000	248	BB	5.7	
53	20:4w3	0.14	18.780	0.223	254	BB	5.7	
54	20:5w3		19.177					M
55	22:0	0.18	19.647	0.046	310	BB	5.8	
56	22:1w11		19.979					M
57	22:1w9	1.14	20.413	0.272	2003	BB	6.3	
58		0.79	21.863	0.000	1398	BB	7.8	
59	21:5w3		22.462					M
60	23:0	15.05	22.865	0.215	26556	BB	8.2	
61	22:4w6		23.534					M
62	22:5w6		24.644					M
63	24:0		25.582					M
64	22:5w3		26.304					M
65	22:6w3	0.60	27.309	-0.386	1062	BB	9.7	
66	24 :1w9		28.155					M
67		1.68	32.650	0.000	2968	BB	13.0	
68		0.21	34.119	0.000	372	BV	15.4	
69		9.65	34.713	0.000	17028	VB	14.4	
Totals:		100.01		-0.374	176442			



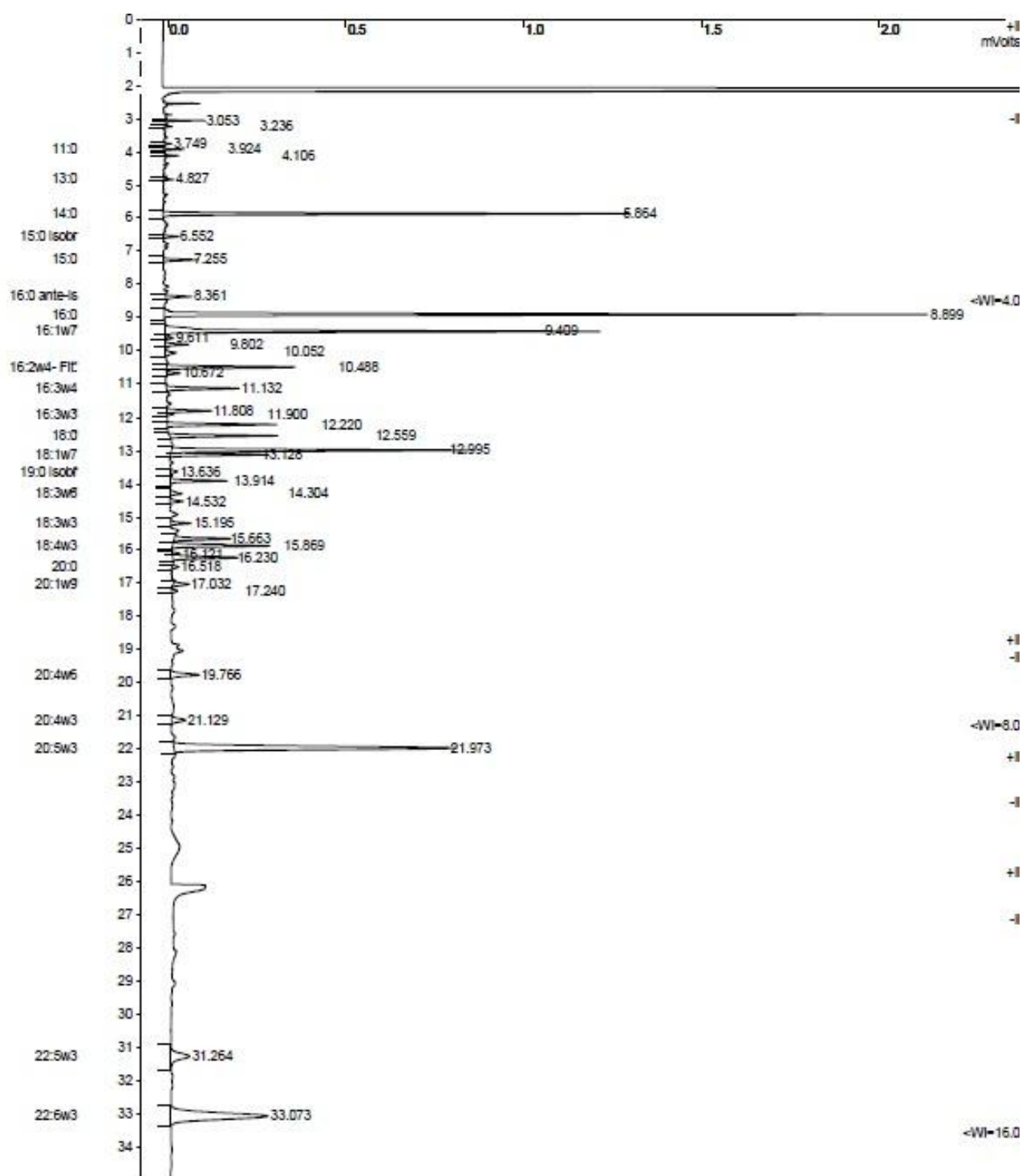
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.37	3.058	0.000	270	BB	2.1	
2		0.60	3.238	0.000	430	BP	1.6	
3		0.16	3.395	0.000	115	PV	2.2	
4		0.14	3.485	0.000	104	VV	2.3	
5		0.27	3.568	0.000	196	VB	2.0	
6		0.65	3.752	0.000	468	BP	1.9	
7	11:0	0.50	3.927	-0.007	357	PV	2.0	
8		0.23	4.109	0.000	167	VB	2.8	
9	12:0	0.15	4.354	0.045	109	BV	2.2	
10		0.26	4.486	0.000	190	VV	2.4	
11		0.17	4.630	0.000	121	VB	2.2	
12	13:0	0.06	4.746	-0.010	43	BV	2.4	
13		0.18	4.819	0.000	132	VB	2.6	
14	14:0 isobr	0.06	5.443	0.137	46	BV	2.4	
15		0.08	5.517	0.000	58	VB	2.9	
16	14:0	5.77	5.868	-0.040	4159	BB	2.7	
17	15:0 isobr	0.29	6.554	-0.021	209	BB	3.0	
18	15:0 ante-is		6.803					M
19	15:0	0.53	7.258	-0.022	382	BV	3.0	
20		0.07	7.359	0.000	48	VB	3.2	
21		0.26	8.031	0.000	188	BB	5.1	
22		0.25	8.277	0.000	182	BV	3.6	
23	16:0 ante-is	1.36	8.372	-0.087	980	VB	3.3	
24	16:0	14.58	8.909	-0.033	10503	BB	3.3	
25	16:1w9		9.156					M
26	16:1w7	9.38	9.416	-0.071	6755	BP	3.4	
27		0.15	9.573	0.000	108	TS	0.0	
28	17:0 isobr.	0.43	9.802	-0.023	309	PB	0.0	
29		0.29	10.054	0.000	211	BB	3.9	
30	16:2w4- Fit.	1.63	10.492	-0.035	1171	BP	3.5	
31	17:0	0.41	10.677	-0.023	294	PB	3.3	
32	16:3w4	1.54	11.135	-0.035	1113	BB	3.5	
33	17:1	0.20	11.603	-0.015	147	BB	4.3	
34		0.31	11.812	0.000	222	BV	3.8	
35	16:3w3	0.15	11.902	-0.029	110	VB	4.7	
36	16:4w3	1.89	12.225	-0.026	1360	BB	3.5	
37	18:0	3.08	12.567	-0.023	2216	BB	3.5	
38	18:1w9	7.79	13.007	-0.054	5615	BV	3.6	
39	18:1w7	2.90	13.137	-0.044	2087	VB	3.5	
40	18:1w5	0.10	13.377	-0.027	72	BB	3.5	
41	19:0 isobr	0.22	13.654	-0.031	157	BB	3.9	
42	18:2w6	1.18	13.920	0.080	851	BB	3.7	
43	18:3w6	0.37	14.313	-0.021	267	BP	3.7	
44	19:0	0.45	14.537	-0.024	322	PB	3.9	
45	18:3w4	0.49	14.944	-0.011	356	BV	7.2	
46	18:3w3	0.58	15.200	-0.033	416	VB	3.8	
47		0.54	15.669	0.000	390	BP	4.1	
48	18:4w3	2.82	15.878	-0.047	2034	PB	4.0	
49		0.19	16.128	0.000	136	BV	4.2	
50		0.41	16.236	0.000	299	VB	4.3	
51	20:0	0.24	16.526	-0.300	175	BB	4.0	
52	20:1w11		16.972					M
53	20:1w9	0.64	17.049	-0.033	459	BB	4.2	
54	20:1w7	0.25	17.253	-0.024	182	BB	4.6	
55		0.15	17.822	0.000	105	BB	4.6	
56	20:2w6	0.21	18.290	-0.027	153	BB	5.7	
57	21:0	0.36	19.060	-0.048	256	BB	5.2	
58	20:4w6	1.31	19.778	-0.035	945	BB	5.7	
59	20:3w3		20.243					M
60	20:4w3	1.48	21.167	-0.032	1067	BB	7.0	
61		0.11	21.677	0.000	77	BP	6.7	
62	20:5w3	17.15	22.016	-0.108	12355	PB	7.1	
63	22:0		22.560					M
64	22:1w11		22.886					M
65	22:1w9		23.105					M
66	21:5w3	1.51	26.261	-0.051	1086	BB	9.4	
67	23:0		26.952					M
68	22:4w6		28.323					M
69	22:5w6	0.31	29.109	-0.052	222	BB	9.5	
70	24:0		31.015					M
71	22:5w3	1.56	31.303	-0.092	1124	BB	11.6	
72	22:6w3	10.21	33.149	-0.196	7356	BB	12.7	
73	24:1w9		33.582					M
Totals:		99.98		-1.528	72037			





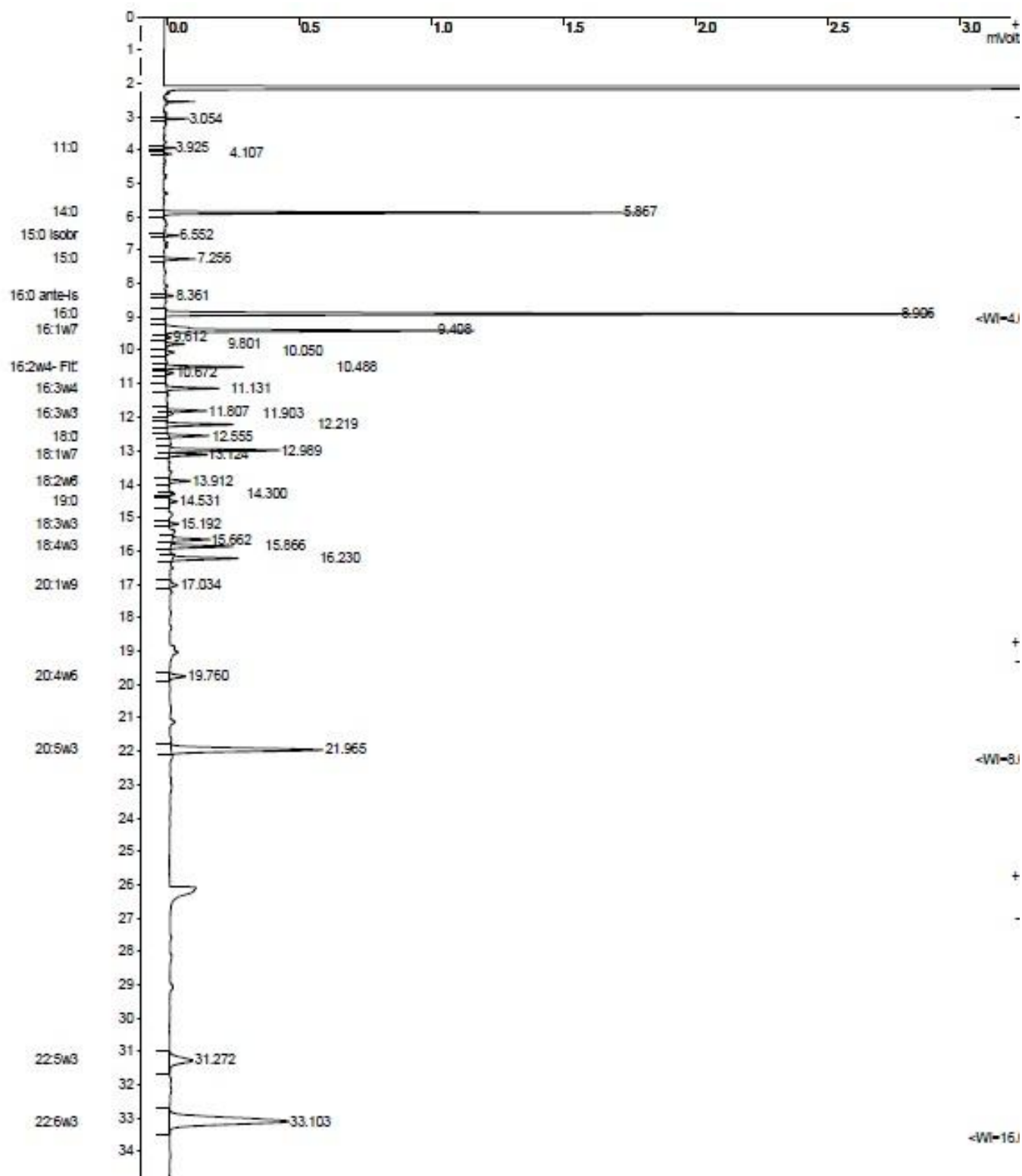
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.26	3.923	-0.011	154	BP	1.9	
2		0.08	4.106	0.000	48	PB	2.5	
3	12:0		4.309					M
4	13:0	0.12	4.829	0.073	71	BB	2.5	
5	14:0 isobr	0.07	5.288	-0.018	40	BB	2.7	
6	14:0	6.90	5.865	-0.043	4147	BB	2.7	
7	15:0 isobr	0.28	6.553	-0.022	171	BB	3.0	
8	15:0 ante-is	0.11	6.779	-0.024	66	BB	3.8	
9	15:0	0.65	7.256	-0.024	392	BB	3.1	
10	16:0 ante-is	0.25	8.364	-0.095	149	BB	3.2	
11	16:0	15.75	8.904	-0.038	9462	BB	3.3	
12	16:1w9		9.156					M
13	16:1w7	14.72	9.416	-0.071	8845	BP	3.4	
14		0.21	9.616	0.000	125	TS	0.0	
15	17:0 isobr.	0.26	9.795	-0.029	154	PB	0.0	
16		0.30	10.053	0.000	178	BB	5.6	
17	16:2w4- Fit.	1.83	10.491	-0.036	1098	BV	3.5	
18	17:0	0.60	10.675	-0.025	359	VB	3.4	
19	16:3w4	1.39	11.135	-0.035	837	BB	3.5	
20	17:1	0.25	11.595	-0.023	149	BB	4.0	
21	16:3w3	0.40	11.807	-0.124	238	BB	3.5	
22	16:4w3	1.66	12.222	-0.029	997	BB	3.6	
23	18:0	4.50	12.566	-0.024	2707	BB	3.6	
24	18:1w9	14.91	13.015	-0.046	8958	BV	3.8	
25	18:1w7	4.95	13.138	-0.043	2977	VB	3.5	
26	18:1w5		13.404					M
27	19:0 isobr	0.23	13.652	-0.033	140	BV	4.2	
28	18:2w6	2.31	13.920	-0.031	1388	VV	3.6	
29		0.14	14.139	0.000	85	TS	0.0	
30	18:3w6	0.48	14.309	-0.025	289	VV	3.5	
31	19:0	0.42	14.534	-0.027	254	VB	4.1	
32	18:3w4	0.55	14.939	-0.016	330	BV	6.9	
33	18:3w3	0.75	15.197	-0.036	451	VB	3.8	
34		0.75	15.670	0.000	448	BV	4.7	
35	18:4w3	1.95	15.872	-0.053	1171	VV	4.1	
36		0.24	16.124	0.000	143	VV	4.2	
37		0.90	16.237	0.000	540	VB	4.5	
38	20:0	0.46	16.522	-0.304	274	BB	4.6	
39	20:1w11		16.972					M
40	20:1w9	1.10	17.047	-0.035	659	BV	4.8	
41	20:1w7	0.35	17.245	-0.032	211	VB	4.8	
42	20:2w6	0.29	18.288	-0.029	177	BB	6.4	
43		0.25	18.862	0.000	153	BV	0.0	
44	21:0	0.37	19.055	-0.053	223	VB	6.3	
45	20:4w6	0.99	19.775	-0.038	594	BB	5.5	
46	20:3w3		20.243					M
47	20:4w3	1.27	21.160	-0.039	763	BB	7.2	
48		0.52	21.677	0.000	313	BV	7.2	
49	20:5w3	9.52	21.988	-0.136	5722	VB	6.9	
50	22:0	0.43	22.572	0.012	256	BP	7.6	
51	22:1w11	0.55	22.891	0.005	330	PV	9.1	
52	22:1w9	0.70	23.201	0.097	423	VB	10.6	
53	21:5w3		26.312					M
54	23:0		26.952					M
55	22:4w6		28.323					M
56	22:5w6		29.161					M
57	24:0		31.015					M
58	22:5w3	0.72	31.287	-0.108	435	BB	11.5	
59	22:6w3	3.33	33.092	-0.253	1999	BB	12.6	
60	24:1w9		33.582					M
Totals:		100.02		-1.821	60093			

## Anexo XVII: Cromatograma e relatório da fração DAG+CH do suplemento alimentar



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.41	3.053	0.000	174	BB	1.5	
2		0.11	3.236	0.000	45	BB	1.5	
3		0.13	3.749	0.000	54	BB	1.7	
4	11:0	0.28	3.924	-0.010	118	BB	1.9	
5		0.23	4.106	0.000	100	BB	2.2	
6	12:0		4.309					M
7	13:0	0.18	4.827	0.071	78	BB	2.3	
8	14:0 isobr		5.306					M
9	14:0	8.93	5.864	-0.044	3792	BB	2.7	
10	15:0 isobr	0.33	6.552	-0.023	141	BB	2.9	
11	15:0 ante-is		6.803					M
12	15:0	0.74	7.255	-0.025	315	BB	3.0	
13	16:0 ante-is	0.64	8.361	-0.098	271	BB	3.2	
14	16:0	17.92	8.899	-0.043	7611	BB	3.3	
15	16:1w9		9.156					M
16	16:1w7	11.03	9.409	-0.078	4683	BP	3.2	
17		0.17	9.611	0.000	71	TS	0.0	
18	17:0 isobr.	0.66	9.802	-0.022	279	PV	0.0	
19		0.45	10.052	0.000	192	VB	0.0	
20	16:2w4- Fit.	3.11	10.488	-0.039	1320	BP	3.4	
21	17:0	0.34	10.672	-0.028	147	PS	3.3	
22	16:3w4	1.88	11.132	-0.038	800	BB	3.6	
23	17:1		11.618					M
24		1.15	11.808	0.000	486	BV	3.5	
25	16:3w3	0.17	11.900	-0.031	71	VB	0.0	
26	16:4w3	2.73	12.220	-0.031	1159	BB	3.5	
27	18:0	2.69	12.559	-0.031	1143	BB	3.6	
28	18:1w9	7.63	12.995	-0.066	3242	BV	3.5	
29	18:1w7	2.47	13.128	-0.053	1051	VB	3.5	
30	18:1w5		13.404					M
31	19:0 isobr	0.28	13.636	-0.049	117	BP	4.4	
32	18:2w6	1.48	13.914	-0.037	628	PS	3.5	
33	18:3w6	0.40	14.304	-0.030	171	BB	4.0	
34	19:0	0.40	14.532	-0.029	170	BB	3.9	
35	18:3w4		14.955					M
36	18:3w3	0.57	15.195	-0.038	242	BB	3.8	
37		1.66	15.663	0.000	706	BV	4.1	
38	18:4w3	2.78	15.869	-0.056	1179	VB	4.0	
39		0.19	16.121	0.000	80	BV	4.2	
40		2.05	16.230	0.000	870	VB	4.4	
41	20:0	0.18	16.518	-0.308	78	BB	3.7	
42	20:1w11		16.972					M
43	20:1w9	0.51	17.032	-0.050	218	BB	4.2	
44	20:1w7	0.19	17.240	-0.037	81	BB	4.4	
45	20:2w6		18.317					M
46	21:0		19.108					M
47	20:4w6	1.14	19.766	-0.047	485	BB	5.6	
48	20:3w3		20.243					M
49	20:4w3	0.67	21.129	-0.070	284	BB	6.6	
50	20:5w3	13.08	21.973	-0.151	5558	BB	6.6	
51	22:0		22.560					M
52	22:1w11		22.886					M
53	22:1w9		23.105					M
54	21:5w3		26.312					M
55	23:0		26.952					M
56	22:4w6		28.323					M
57	22:5w6		29.161					M
58	24:0		31.015					M
59	22:5w3	1.60	31.264	-0.131	678	BB	11.4	
60	22:6w3	8.44	33.073	-0.272	3584	BB	12.4	
61	24 :1w9		33.582					M
Totals:		100.00		-1.894	42472			

## Anexo XVIII: Cromatograma e relatório da fração MAG do suplemento alimentar





Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.33	3.054	0.000	141	BB	1.4	
2	11:0	0.23	3.925	-0.009	97	BB	1.8	
3		0.18	4.107	0.000	75	BB	2.2	
4	12:0		4.309					M
5	13:0		4.756					M
6	14:0 isobr		5.306					M
7	14:0	12.15	5.867	-0.041	5166	BB	2.6	
8	15:0 isobr	0.41	6.552	-0.023	175	BB	2.8	
9	15:0 ante-is		6.803					M
10	15:0	0.88	7.256	-0.024	373	BB	2.9	
11	16:0 ante-is	0.24	8.361	-0.098	104	BB	2.8	
12	16:0	23.84	8.906	-0.036	10141	BB	3.3	
13	16:1w9		9.156					M
14	16:1w7	10.63	9.408	-0.079	4523	BB	3.3	
15		0.16	9.612	0.000	66	TS	0.0	
16	17:0 isobr.	0.70	9.801	-0.023	297	BB	3.4	
17		0.35	10.050	0.000	148	BB	3.6	
18	16:2w4- Fit.	2.56	10.488	-0.039	1091	BB	3.5	
19	17:0	0.24	10.672	-0.028	103	BB	3.3	
20	16:3w4	1.77	11.131	-0.039	755	BB	3.5	
21	17:1		11.618					M
22		1.34	11.807	0.000	569	BV	3.4	
23	16:3w3	0.20	11.903	-0.028	86	VB	0.0	
24	16:4w3	2.27	12.219	-0.033	965	BB	3.6	
25	18:0	1.36	12.555	-0.035	579	BB	3.6	
26	18:1w9	3.79	12.989	-0.072	1613	BV	3.6	
27	18:1w7	1.28	13.124	-0.057	543	VB	3.5	
28	18:1w5		13.404					M
29	19:0 isobr		13.685					M
30	18:2w6	0.77	13.912	-0.039	326	BB	3.8	
31	18:3w6	0.11	14.300	-0.033	48	BB	2.8	
32	19:0	0.32	14.531	-0.030	135	BB	3.8	
33	18:3w4		14.955					M
34	18:3w3	0.35	15.192	-0.041	150	BB	3.7	
35		1.45	15.662	0.000	618	BV	3.9	
36	18:4w3	2.37	15.866	-0.059	1007	VB	3.9	
37		2.48	16.230	0.000	1057	BB	4.0	
38	20:0		16.826					M
39	20:1w11		16.972					M
40	20:1w9	0.43	17.034	-0.048	181	BB	4.5	
41	20:1w7		17.277					M
42	20:2w6		18.317					M
43	21:0		19.108					M
44	20:4w6	0.86	19.760	-0.053	367	BB	5.7	
45	20:3w3		20.243					M
46	20:4w3		21.199					M
47	20:5w3	9.47	21.965	-0.159	4026	BB	6.6	
48	22:0		22.560					M
49	22:1w11		22.886					M
50	22:1w9		23.105					M
51	21:5w3		26.312					M
52	23:0		26.952					M
53	22:4w6		28.323					M
54	22:5w6		29.161					M
55	24:0		31.015					M
56	22:5w3	2.47	31.272	-0.123	1052	BB	11.3	
57	22:6w3	14.00	33.103	-0.243	5956	BB	12.4	
58	24 :1w9		33.582					M
Totals:		99.99		-1.492	42533			